

**UNIVERSITE MONTPELLIER II**  
**SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

Ecole doctorale : sciences des procédés – sciences des aliments

Discipline : Biochimie

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Christelle BAYRAS**

Le 16 Avril 2013

***Influence de la lipophilisation de l'acide rosmarinique  
sur ses propriétés antioxydantes***

**JURY**

Claude GENOT	INRA, UR1268, Nantes	Rapporteur
Béatrice MORIO LIONDORE	INRA, UMR 1019, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Michel LINDER	ENSAIA-INPL, Nancy	Examineur
Hélène FULCRAND	INRA UMR 1083, Montpellier	Examineur
Pierre VILLENEUVE	CIRAD, UMR 62, Montpellier	Co-directeur de thèse
Gérard CABELLO	INRA UMR 866, Montpellier	Co-directeur de thèse

## **Remerciements**

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR IATE sous la direction du Dr. Pierre Villeneuve et au sein de l'UMR DMEM, sous la direction du Dr. Gérard Cabello.

Je tiens donc tout d'abord à remercier sincèrement le Dr. Pierre Villeneuve pour sa patience, sa disponibilité, ses encouragements et pour m'avoir accordé sa confiance pour présenter nos travaux lors de plusieurs congrès internationaux. Puis, le Dr. Gérard Cabello pour ses encouragements, sa disponibilité, son investissement, et pour m'avoir transmis son savoir avec beaucoup de pédagogie. Je souhaite également vous remercier conjointement de m'avoir encadrée avec confiance et laissé une large autonomie. Votre soutien pendant dans les moments difficiles, votre sympathie, vos conseils ainsi que votre expertise en chimie et en biologie m'ont permis de mener à bien cette thèse à l'interface.

Je tiens à remercier les personnes grâce à qui ce projet a pu être réalisé dans de bonnes conditions, le Dr. Chantal Cabello et Dr. Béatrice Chabi qui m'ont permis de gérer au quotidien ce travail, d'avoir un avis critique sur les résultats et sur la mise en place des protocoles et pour leur gentillesse, le Dr. Jérôme Lecomte pour sa rigueur scientifique et sa disponibilité, le Dr Maria Figueroa-Espinoza pour ses conseils et son soutien, le Dr. Mickaël Laguerre pour m'avoir transmis le flambeau ainsi que ses connaissances, le Prof. Eric Dubreucq pour sa disponibilité, Elodie Jublanc pour m'avoir initié à la microscopie confocale et pour sa bonne humeur, le Dr. Vincent Ollendorff pour son regard extérieur qui m'a permis de me poser les bonnes questions, Laurence Pessemesse et Barbara Vernus pour leur gentillesse et pour m'avoir accordé de leur temps pour les westerns blot, Fabienne Cortade pour sa sympathie et sa disponibilité à chaque fois que je souhaitais commander un produit.

Je remercie également pour leur accueil au sein de l'UMR DMEM, le Dr. François Casas, le Dr. Anne Bonnieu, le Dr. Charles Coudray, le Dr. Christine Coudray ainsi que Fourret Gilles et Robin Dumas.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Michel Pina, à Georges Piombo, Marie-Paul Piombo et à Nathalie Barouh pour leur aide lors de l'ultime étape de rédaction, merci.

Je remercie sincèrement tous les membres du jury, le Dr Béatrice Morio, le Dr. Claude Genot, le Dr. Hélène Fulcrand et le Prof. Michel Linder qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Vos commentaires pertinents et vos corrections m'ont aidé à améliorer ce manuscrit.

L'aboutissement de ce travail est lié également à plusieurs collaborations. J'adresse mes remerciements au Prof. Jochen Weiss et à Sarisa Suriyarak de l'Université d'Hohenheim de Stuttgart pour leur accueil et pour m'avoir transmis leurs connaissances dans l'évaluation des propriétés antimicrobiennes. Je remercie le Prof. Aude Vernhet de l'UMR SPO pour m'avoir permis de réaliser les mesures par DLS, le Prof. Sylvie Marchesseau et Célie Rulhière de l'Université Montpellier II pour m'avoir formée sur le tensiomètre à goutte et le Prof. Thierry Durand et le Dr. Laurence Balas de l'Université Montpellier I pour la réalisation des spectres RMN.

Ces travaux de thèse n'auraient pas pu être réalisés sans l'aide de Claire Boscus, qui a réalisé les mesures de tensiométrie et Julien Fernandez qui a effectué la synthèse des rosmarinates de diacylglycérol. Je vous remercie pour vos qualités humaines et scientifiques et pour votre contribution à ce projet de recherche.

Waed, Sophie, Mélanie, Ebru, Audrey, Gwenn, Aurélie, Florian, Anthony, Ingrid, Livi, Aymeric, Erika, Claudia, Manuela, merci pour votre bonne humeur. Ann-Dorit thank you for helping me to work on my accent. Un grand merci à Clara et Valérie pour toute la gestion administrative et surtout pour leur gentillesse.

Un grand merci au Dr. Marlène pour ces nombreux fous rires et son soutien. J'ai adoré partir à New York avec toi, c'était génial.

Nath je te remercie pour ta gentillesse et ton aide précieuse au quotidien. Tu es le meilleur coach mental.

Erwann je te remercie pour ton aide indispensable en chimie mais aussi pour ta bonne humeur et ta bienveillance.

Merci Karim pour ta gentillesse et tes conseils pour m'aider à passer à l'étape suivante mais également pour nos nombreux fous rires « il est pas sérieux ».

Merci Bruno, alias Maroon 5, pour ton aide au labo, ton esprit critique et ton sens de l'efficacité. Tu as été également un adversaire de farces redoutable.

Merci Guilherme pour ta gentillesse et les havaianas.

Stéphane, je te remercie pour tes conseils, ton écran, ta bonne humeur et merci à Emilie pour ces soirées time's up.

Je remercie Christine Char pour sa gentillesse et pour le super montage vidéo.

Je souhaite également vous remercier pour tous vos mots d'encouragements : Nath « quelles sont tes priorités », Bruno « joyeux Lundi », Erwann « on ne lâche rien », Karim « c'est bon ça », Guilherme « calme bi », Marlène « allez la pêche », Stéphane « pas de stress, il y a point S » et pour finir la phrase culte de Pierre Beaudeau « le CIRAD: c'est une qualité de vie ».

Puis, je tiens à remercier tous mes amis Laurine, Marie, Cheikh, Manu, Najet Marie et Ol, Linda et Sami ainsi que mes cousines Marlène, fanny et Elodie qui m'encouragent et trouvent toujours les mots justes. Merci à ma marraine Nadia d'être aussi attentionnée.

Je tiens pour finir à remercier du fond du cœur mes parents pour leur amour, leur soutien à chaque étape, mes petits frères, Benoit, Alex et Vincent qui savent toujours me faire rire et enfin un grand merci à mon superman, Nitha, pour m'avoir accompagné, supporté et encouragé dans tous mes projets.



# Table des matières

Travaux relatifs à cette étude .....	10
Liste des figures et tableaux .....	12
Liste des abréviations .....	18
Introduction générale .....	21
 Chapitre I : Etude bibliographique .....	 25
 Partie I : Stress oxydant.....	 26
1 Les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs).....	27
1.1 Radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) .....	28
1.2 Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ).....	28
1.3 Radicaux peroxydes .....	29
1.4 Le monoxyde d'azote .....	30
1.5 La double vie des espèces réactives de l'oxygène .....	30
2 Origine cellulaire des espèces réactives de l'oxygène .....	32
2.1 Origines enzymatiques des EROs.....	33
2.1.1 NADPH oxydase .....	33
2.1.2 Xanthine oxydase.....	33
2.2 La mitochondrie .....	34
2.2.1 La source énergétique de la cellule.....	34
2.2.2 La mitochondrie, une source majeure d'anions superoxydes.....	36
2.2.3 Les EROs peuvent altérer l'activité mitochondriale .....	38
3 Dommages induits par le stress oxydatif.....	39
3.1 Oxydation des lipides .....	39
3.2 Domage sur l'ADN.....	41
3.3 Oxydation des protéines .....	42

Partie II : Les antioxydants .....	45
1 Antioxydants enzymatiques.....	45
1.1 Superoxyde dismutase .....	45
1.2 Catalases et la glutathion peroxydase .....	46
1.3 Le système thiorédoxine (TRX) .....	47
2 Défenses antioxydantes non enzymatiques .....	48
2.1 Glutathion et coenzyme Q .....	48
2.2 Antioxydants exogènes : les polyphénols.....	49
2.2.1 Généralités.....	49
2.2.2 Activité biologique des polyphénols.....	52
2.2.3 Biodisponibilité des polyphénols.....	56
Partie III : Fonctionnalisation des antioxydants.....	58
1 Les antioxydants mitochondriotropiques .....	59
1.1 Conjugaison d'antioxydants au Triphenylphosphonium.....	61
1.2 Les peptides SS et MPP.....	63
2 Fonctionnalisation des antioxydants par lipophilisation.....	64
2.1 Stratégie de lipophilisation.....	66
2.2 Activité antioxydante des phénolipides en émulsions.....	70
2.3 Activité antioxydante des phénolipides dans des liposomes .....	73
2.4 Activité antioxydante des phénolipides en milieu cellulaire .....	75
2.5 L'effet «cut-off» .....	77
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	79
1 Matériels.....	80
2 Méthodes .....	82
2.1 Synthèse des dérivés lipidiques d'acide rosmarinique .....	82
2.1.1 Synthèse des rosmarinates d'alkyle .....	82

2.1.2	Purification des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique.....	83
2.1.3	Suivi des synthèses des esters de l'acide rosmarinique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	84
2.1.4	Synthèse des rosmarinates de diacylglycérol .....	85
2.1.5	Suivi des synthèses d'esters de l'acide rosmarinique par densitométrie.....	88
2.1.6	Identification par spectrométrie de masse des esters de l'acide rosmarinique.....	89
2.1.7	Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	89
2.2	Détermination des propriétés physico-chimiques .....	90
2.2.1	Concentration micellaire critique .....	90
2.2.2	Mesure de la taille des particules des rosmarinates d'alkyle par la diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	92
2.3	Stabilité hydrolytique des rosmarinates d'alkyle .....	92
2.4	Activité antioxydante.....	93
2.4.1	Mesure des espèces oxydantes par la sonde diacétate de 2',7-dichlorodihydrofluoréscine.....	93
2.4.2	Cinétique de la production d'EROs pendant deux heures.....	94
2.4.3	Quantification de l'ADN par le réactif de Hoechst 33258.....	95
2.5	Etude microscopie confocale et biphotonique .....	96
2.5.1	Localisation des rosmarinates d'alkyle par microscopie confocale .	96
2.5.2	Etude de la co-localisation mitochondriale .....	97
2.5.3	Etude de la co-localisation mitochondriale par microscopie biphotonique.....	98
2.6	Dosage de la concentration intracellulaire par CLHP .....	98
2.7	Cytotoxicité .....	99
2.7.1	Mesure de la cytotoxicité des rosmarinates en fonction de la libération de la LDH.....	99
2.7.2	Cytotoxicité par cytométrie de flux.....	101
2.8	Activité antimicrobienne.....	102

Chapitre III : Résultats et Discussion.....	104
Partie I : Synthèse des dérivés lipidiques de l'acide rosmarinique .....	107
1 Synthèse de rosmarinates d'alkyle.....	107
2 Synthèse de rosmarinates de diacylglycérol .....	108
2.1 Estérification de Mitsunobu sur l'acide rosmarinique .....	109
2.2 Déprotection du groupement isopropylidène .....	112
2.3 Estérification des positions 2 et 3 du rosmarinate de glycérol par la lipase B de <i>Candida antarctica</i> .....	114
2.4 Caractérisation des rosmarinates de diacylglycérol.....	117
2.5 Conclusions .....	119
Partie II : Evaluation des propriétés antioxydantes des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique.....	121
1 Etude de l'activité antioxydante des rosmarinates d'alkyle .....	123
2 Activité antioxydante des rosmarinates de diacylglycérol .....	128
3 Comparaison de l'activité antioxydante des esters d'acide rosmarinique avec la vitamine E et C .....	132
4 Conclusions.....	135
Partie III : Etude du mécanisme d'action des rosmarinates d'alkyle sur culture cellulaire .....	136
1 Etude cinétique de la quantité d'EROs en fonction des rosmarinates d'alkyle	137
1.1 Etude cinétique pendant 2 heures de traitement dans le tampon Locke et le DMEM SRP.....	137
1.1.1 Comparaison des effets à court et long termes des phénolipides .	143
2 Etude de la localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle .....	145
2.1 Etude cinétique du transport et de la localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle .....	146
2.2 Localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle après 24 heures de traitement.....	149
2.3 Conclusions .....	150

3 Propriétés d'agréations des rosmarinales d'alkyle .....	151
3.1 Détermination de la taille des rosmarinales d'alkyle en phase aqueuse par DLS.....	151
3.2 Détermination de la concentration micellaire critique de R <sub>10</sub> par un tensiomètre à goutte .....	153
3.3 Conclusions.....	155
4 Etude de la localisation intracellulaire de R <sub>10</sub> .....	155
4.1 Détermination <i>in vitro</i> de l'inhibition du mitotracker par les rosmarinales d'alkyle.....	155
4.2 Evolution dans le temps de la localisation mitochondriale de R <sub>10</sub> dans le tampon Locke .....	157
4.3 Etude de la co-localisation mitochondriale de R <sub>10</sub> après 2 et 24 heures de traitement.....	158
4.4 Conclusions.....	161
5 Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle .....	161
5.1 Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle après 2 heures de traitement..	162
5.2 Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyles à 24 heures .....	163
5.3 Conclusions.....	165
6 Mécanisme d'action des rosmarinales d'alkyle .....	166
Partie IV : Résultats complémentaires.....	168
1 Activité antibactérienne des rosmarinales d'alkyle.....	168
Conclusions et Perspectives.....	171
Références bibliographiques .....	177
Annexes.....	195

## Travaux relatifs à cette étude

**Publications** (Les publications sont présentées en annexe 2)

Bayrasy C, Durand E, Fernandez J, Laguerre M, Balas L, Wrutniak-Cabello C, Villeneuve P. Synthesis of structured phenolipid from rosmarinic acid and evaluation of antioxidant activity in emulsion and in cells. En préparation pour J. Am. Oil. Chem. Soc.

Bayrasy C, Laguerre M, Lecomte J, Weiss J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. Boosting antioxidants by lipophilization through cell uptake increase and mitochondria targeting. *Journal Pharmaceutical research*, (acceptée)

Suriyarak S, Bayrasy C, Villeneuve P, and J. Weiss. Antimicrobial Activities of “Phenolipids”: Impact of Fatty Acid Chain Length of Rosmarinate Esters (RE). *Journal of Food Protection* (acceptée)

Laguerre M, Bayrasy C, Lecomte J, Decker EA, Villeneuve P. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (sous presse)

Laguerre M, Bayrasy C, Lecomte J, Villeneuve P. Role of hydrophobicity on antioxidant capacity in emulsion. A paradigm shift from the polar paradox to the cut-off theory. AOCs book chapter, editor: Dr Amy Logan

Laguerre M, Bayrasy C, Lecomte J, Villeneuve P. How to boost antioxidants by lipophilization? (2013), *Biochimie*, 95(1), 20-26

Panya A, Kittipongpittaya K, Laguerre M, Bayrasy C, Lecomte J, Villeneuve P, McClements DJ, Decker EA. Interactions between  $\alpha$ -Tocopherol and Rosmarinic Acid and Its Alkyl Esters in Emulsions: Synergistic, Additive, or Antagonistic Effect? (2012). *Journal Agricultural and food chemistry*, 60(41), 10320-10330

Panya, A, Laguerre, M; Bayrasy, C; Lecomte, J; Villeneuve, P; McClements, DJ, Decker, EA. An Investigation of the Versatile Antioxidant Mechanisms of Action of Rosmarinate Alkyl Esters in Oil-in-Water Emulsions. (2012). *Journal Agricultural and food chemistry*, 60(10), 2692-2700

## **Communications orales à des congrès internationaux**

Bayrasy C, Laguerre M, Chabi B, Jublanc E, Wrutniak-Cabello C, Durand E, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Decker E A, Cabello G, Villeneuve P\*. Effect of lipophilization on antioxidant activity of phenolic acids: cut-off effect and mitochondria targeting. ISNFF 2012 Annual Conference & Exhibition, 2-6 Décembre, Hawai, USA

Bayrasy C\*, Laguerre M, Lecomte J, Weiss J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. Targeting mitochondria to improve antioxidant activity of polyphenols through the grafting of lipid moiety. 103nd AOCS Annual Meeting & Expo, 29 Avril-02 Mai 2012, Long Beach, USA

Suriyarak S\*, Bayrasy C, Villeneuve P, Weiss J. Antimicrobial Activities of "Phenolipids": Impact of Fatty Acid Chain Length of Rosmarinate Esters (RE). 4th International Symposium on the Delivery of Functionality in Complex Food Systems, 21-24 Août, 2011, Guelph, Canada

## **Communications affichées à des congrès internationaux**

Bayrasy C Suriyarak S, Laguerre M, Lecomte J, Weiss J, Chabi B, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P Antioxidant and antimicrobial activity of rosmarinic acid fatty esters., 8th Euro Fed Lipid Congress, 21-24 Novembre 2010, Munich, Allemagne

Bayrasy C, Laguerre M, Lecomte J, Chabi B, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. Impact of the location of rosmarinate esters in cellular system on their antioxidant activity. 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, 01-04 Mai 2011, Cincinnati, USA

# Liste des figures et tableaux

## Figures :

Figure 1 : Production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase des cellules phagocytaires .....	31
Figure 2 : Stress oxydatif induit par la production d'EROs exogènes et/ou endogènes .....	32
Figure 3 : Microscopie électronique d'une mitochondrie.....	34
Figure 4 : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	35
Figure 5 : Production d'anions superoxydes après une inhibition du complexe I par la roténone et du complexe III par l'antimycine A.....	37
Figure 6 : Réactions de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés et les produits d'oxydation.....	40
Figure 7 : Dommage sur l'ADN après une attaque radicalaire.....	42
Figure 8 : Oxydation des acides aminés après différents types d'attaque radicalaire.....	43
Figure 9 : Structures chimiques des acides phénoliques simples et de ses principaux dérivés.....	50
Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes.....	51
Figure 11 : Stabilisation du radical phénolique .....	53
Figure 12 : Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes.....	54
Figure 13 : Mécanisme de l'activité antioxydante. D'après Leopoldini <i>et al.</i> , 2011 ...	54
Figure 14 : Transport du TPP <sup>+</sup> vers la matrice mitochondriale .....	61
Figure 15 : Estérification de la vitamine E (MitoVitE), du Coenzyme Q (MitoQ) et de l'èbselen (Mitoperoxidase).....	62



Figure 16 : SS-02 Dmt-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH <sub>2</sub> , SS-31 D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH <sub>2</sub> , SS-20 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub> .....	63
Figure 17 : Réaction de lipophilisation de l'acide rosmarinique avec différents alcools gras .....	68
Figure 18 : Dérivés d'acide férulique : a) 1-féruloyl-dibutyroyl-glycérol, b) 2,3-bis-butyryloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl butyrate, c) 2,3-bis-hexanoyloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl hexadécanoate .....	69
Figure 19 : Emulsion huile dans eau. ....	70
Figure 20 : Influence de la longueur de la chaîne alkyle des chlorogénates (a) et des rosmarinates (b) sur leur capacité à limiter l'oxydation de l'huile de tung dans une microémulsion huile dans eau. ....	71
Figure 21 : Localisation des chlorogénates d'alkyle en fonction de la longueur de la chaîne alkyle : a) esters à chaînes courtes, b) esters à chaînes moyennes, c) esters à chaînes longues. ....	72
Figure 22 : Localisation du daidzéine et de ses esters alkoxyles dans la bicouche lipidique d'un liposome. ....	75
Figure 23 : Activité antioxydante des chlorogénates d'alkyle sur fibroblastes humains .....	76
Figure 24 : Comportement des molécules amphiphiles à l'interface air/ eau dans une phase aqueuse et en fonction de leur concentration .....	91
Figure 25 : Cytotoxicité du rosmarinate de décyle (R <sub>10</sub> ) à 25 µM dans le tampon Locke après 2 heures d'incubation .....	102
Figure 26 : Estérification de l'acide rosmarinique : R <sub>4</sub> (rosmarinate de butyle), R <sub>8</sub> (rosmarinate d'octyle), R <sub>10</sub> (rosmarinate de décyle), R <sub>12</sub> (rosmarinate de dodécyle), R <sub>16</sub> (rosmarinate d'héxadécyle), R <sub>18</sub> (rosmarinate d'octadécyle) .....	108
Figure 27 : Synthèse des rosmarinates de diacylglycérol.....	109

Figure 28 : Mécanisme de l'estérification de l'acide rosmarinique par l'IPG via la réaction de Mitsunobu mettant en jeu le complexe DIAD-PPH <sub>3</sub> .....	110
Figure 29 : Suivi cinétique par densitométrie à 328 nm après 5 h de réaction. ....	111
Figure 30 : Cinétique d'estérification de l'acide rosmarinique avec l'IPG via la réaction de Mitsunobu. ....	112
Figure 31 : Déprotection de l'IPG par catalyse acide avec l'amberlite 15 wet .....	112
Figure 32 : Chromatogrammes des produits réactionnels de l'étape de déprotection de l'acétal du rosmarinate d'isopropylidène glycérol. ....	113
Figure 33 : Spectre de masse du glycérol rosmarinate [M-H]=433 uma.....	114
Figure 34 : Synthèse des 1 rosmarinoyl 2,3-dilauroyl glycérol et 1 rosmarinoyl 2,3-dioctadécanoyl glycérol .....	115
Figure 35 : Synthèse des 1 rosmarinoyl 2,3 dipentanoyl glycérol et 1 rosmarinoyl 2,3-dioctanoyl glycérol.....	116
Figure 36 : Formule chimique du 1-rosmarinoyl-2,3-dioctadécanoyl glycérol (RDAG <sub>18</sub> ) .....	118
Figure 37 : Hydrolyse de la DCFH <sub>2</sub> -DA par les estérases, puis oxydation de la DCFH <sub>2</sub> en DCF fluorescent (λ <sub>ex</sub> : 485 nm ; λ <sub>em</sub> : 530 nm) .....	123
Figure 38: Influence de l'acide rosmarinique et de ses esters en fonction de la concentration utilisée (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 μM) après 24 heures de traitement .....	125
Figure 39 : Activité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne des rosmarinates d'alkyle.....	126
Figure 40 : Influence de l'acide rosmarinique et de ses esters de diacylglycérol sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 μM) après 24 heures de traitement.....	129

Figure 41 : Activité antioxydante des rosmarinates de diacylglycérol en fonction de la longueur de la chaîne alkyle du diacylglycérol.....	130
Figure 42 : Influence de R, R <sub>10</sub> , RDAG <sub>12</sub> , vitamine E, vitamine C et de leur association sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (0,5 ; 5 et 25 µM) .....	133
Figure 43 : Activité antioxydante des rosmarinates d'alkyle dans les cellules cultivées dans le tampon Locke pH=7.2 pendant deux heures à 5, 10, et 25 µM. ....	138
Figure 44 : Activité antioxydante des rosmarinates d'alkyle dans les cellules cultivées dans le DMEM SRP à pH= 7,2, à 37 °C et à 25 µM (bleu) et à 5 µM (Rouge). ....	140
Figure 45 : Modification de la concentration d'EROs intracellulaires par l'acide rosmarinique : couplage des activités antioxydantes et pro-oxydantes .....	141
Figure 46 : Evolution dans le temps de la quantité d'EROs cellulaires en présence des rosmarinates d'alkyle à 25 µM pendant 2h, à 37°C dans le DMEM. ....	143
Figure 47 : Chromatogrammes de la stabilité de le rosmarinate d'octadécyle (25 µM) dans un tampon PBS à pH 7,2 à 37 °C pendant 24 h. a) T=0h, b) T=24h.....	145
Figure 48 : Spectre d'émission de R dans des cellules après 24 h de traitement...	146
Figure 49 : Etude de l'entrée de l'acide rosmarinique et de ses esters (25 µM) dans les fibroblastes en fonction du temps (15, 35 et 120 minutes).....	147
Figure 50 : Etude de l'entrée de l'acide rosmarinique et de ses esters (25 µM) dans les fibroblastes 24 heures après le début du traitement .....	149
Figure 51 : Taille (Zave nm) des particules des rosmarinates d'alkyle à 25 µM dans le tampon Locke (point noir) et dans le DMEM SRP (point gris) .....	152
Figure 52 : Détermination de la taille des particules formées par R <sub>18</sub> pour des concentrations de 0,5 à 25 µM dans le DMEM SRP à 37°C (taille moyenne) .....	153
Figure 53 : Concentration micellaire critique du rosmarinate de décyle estimée par la tension de surface en fonction de la concentration dans un tampon phosphate (PBS) à pH=7,2.....	154

Figure 54 : Inhibition de la fluorescence du Mitotracker red (10 $\mu$ M) par R, R <sub>4</sub> , R <sub>10</sub> et R <sub>18</sub> à 10 $\mu$ M dans un tampon phosphate à pH=7,2 et à 37 °C. ....	156
Figure 55 : Evolution de la fluorescence du MTR en fonction du temps dans les fibroblastes traités par R <sub>10</sub> (25 $\mu$ M) dans le tampon Locke par microscopie confocale .....	157
Figure 56 : Localisation des rosmarinales d'alkyle à 25 $\mu$ M (vert) et des mitochondries marquées avec le MTR (rouge) après 2 heures de traitement dans le DMEM+sérum à 37 °C.....	158
Figure 57 : Etude de la co-localisation du rosmarinate de décyle et des mitochondries après 24 heures de traitement.....	160
Figure 58 : Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle déterminée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH). ....	162
Figure 59 : Cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters alkyles en fonction de la concentration (5 ; 10 et 25 $\mu$ M) après 2 heures de traitement dans le tampon Locke (blanc) ou dans le DMEM (gris).....	163
Figure 60 : Cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (5 ; 10 et 25 $\mu$ M) après 24 heures de traitement dans le milieu de culture (DMEM + sérum).....	164
Figure 61 : Activité antibactérienne des rosmarinales d'alkyle estimée par le log CFU/mL en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. ....	169

## Tableaux :

Tableau 1 : Référence des réactifs chimiques et des enzymes fournis .....	80
Tableau 2 : Gradient de purification des esters d'alkyles de l'acide rosmarinique ....	84
Tableau 3 : Gradient d'élution employé pour la séparation chromatographique de l'acide rosmarinique et de ses esters .....	84
Tableau 4 : Temps de rétention des rosmarinales d'alkyle.....	85
Tableau 5 : Rapport frontal des réactifs et des produits de la synthèse des rosmarinales de diacylglycérol par densitométrie à 328 nm.....	88
Tableau 6 : ions obtenus par APCI (-) des rosmarinales de diacylglycérol .....	117
Tableau 7: RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du 1 rosmarinoyl 2,3 dioctadécanoyl glycérol (RDAG <sub>18</sub> )	118
Tableau 8 : LogP théorique des rosmarinales d'alkyle .....	127
Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques des rosmarinales de diacylglycérol .....	131

## Liste des abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPIs	Acides gras polyinsaturés
ANT	Adenine nucleotide translocase
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adénosine triphosphate
$a_w$	Activité thermodynamique de l'eau
BDE	Bond dissociation enthalpy
CAT	Conjugated autoxidizable triene
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFU	Colonie formant une unité
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
CoQ	Coenzyme Q
Cyt C	Cytochrome C
DAG	Diacylglycérol
DCFH <sub>2</sub> -DA	Diacétate dihydrochlorofluoréscine
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
Dmt	2'-6'-diméthyltyrosine
DMSO	Diméthyle sulfoxide
EGCG	Epigallocatechine gallate
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
FeSO <sub>4</sub>	Sulfate de fer
GPx	Gutathion peroxydase
GSH	Glutathion
HEPES	Acide hydroxyéthylpipérazineéthane
HLB	Hydrophile lipophile balance
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Hydroperoxydes

mtGFP	Mitochondria green fluorescent protein
MDA	Malondialdéhyde
HOCl,	Acide hypochloreux
IP	Iodure de propidium
IPG	Isopropylidène glycol
L <sup>•</sup>	Radical alkyle
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxy
LOOH	Hydroxyperoxyde
MPP	Mitochondria penetrating peptides
mtGFP	Mitochondrial Green fluorescent protein
MTR	Mitotracker
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NF <sub>κ</sub> B	Nuclear factor <i>κ</i> B
NO <sup>•</sup>	Monoxyde d'azote
O <sub>2</sub>	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superoxyde
OH	Radical hydroxyle
<sup>•</sup> OONO	Peroxynitrite
PBS	Phosphate buffer solution
PI	Polydispersité
PPH <sub>3</sub>	Triphénylphosphine
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
Q	Ubiquinone
R	Acide rosmarinique
RDAG	Rosmarinate de diacylglycérol
Rf	Rapport frontal
RMN	Resonance magnétique nucléaire
ROO <sup>•</sup>	Alkylperoxy
ROONO	Alkylperoxynitrite
SOD	Superoxyde dismutase
SRP	Sans rouge de phénol

SS	Szeto Schiller
THF	Tetrahydrofurane
TIM	Translocase of inner membrane
TOM	Translocase of outer membrane
TPP <sup>+</sup>	Triphénylphosphonium
TRX	Thiorédoxine
TRX	Thiorédoxine réductase
VDAC	Voltage dependant anion channel
XDH	Xanthine déshydrogénase
XOR	Xanthine oxydo-réductase
XO	Xanthine oxydase



# Introduction générale

Les phénomènes d'oxydation constituent un problème dans les domaines de la nutrition et de la santé. En effet, dans l'industrie agroalimentaire, de nombreux produits de type émulsions huile dans eau sont très sensibles à ces processus. Leur dégradation peut altérer les qualités sensorielles du produit (phénomène de rancissement) ou, de manière plus préoccupante, induire une toxicité pour le consommateur en raison de la formation de composés secondaires. Dans ce contexte, l'emploi d'antioxydants s'est avéré efficace pour améliorer la conservation des aliments. En effet, leur capacité à neutraliser les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs) et leur aptitude à chélater les métaux limitent les dégradations oxydatives des matrices alimentaires. L'étude du mode d'action de ces molécules a permis de mettre en évidence le phénomène du paradoxe polaire (Porter *et al.*, 1989). Selon ces auteurs, les molécules hydrophobes seraient plus efficaces dans une émulsion huile dans eau que les antioxydants polaires. Plus tard, en 1994, Frankel *et al.* (1994) ont expliqué ce phénomène par le fait que ces dernières se situeraient idéalement à l'interface de l'émulsion concernée. Cependant, ces travaux ont comparé des antioxydants de structures chimiques et de polarités différentes (vitamine E, vitamine C). Ainsi, afin d'évaluer plus précisément l'influence de l'hydrophobie d'une molécule, différentes longueurs de chaînes alkyles (4, 8, 10, 12, 16, 18, 20 atomes de carbone) ont été greffées sur plusieurs composés tels que l'acide chlorogénique (López Giraldo *et al.*, 2007), l'acide rosmarinique (Lecomte *et al.*, 2010), ou les hydroxytyrosols (De Pinedo *et al.*, 2007). L'ensemble des résultats obtenus a montré d'une part, que l'activité antioxydante était maximale pour une longueur de chaîne alkyle comprise entre 8 et 12 atomes de carbone, et d'autre part, que la perte d'activité des esters les plus hydrophobes était liée à leur organisation micellaire dans la phase aqueuse ou à leur solubilisation dans les gouttelettes lipidiques, limitant ainsi leur localisation à l'interface (Laguerre *et al.*, 2009; Laguerre *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2009). Ainsi, ajuster la lipophilie d'un antioxydant s'est avéré efficace pour limiter l'oxydation lipidique dans les émulsions huiles dans eau.

Sur le plan biologique, tous les organismes aérobies sont également confrontés à ces phénomènes d'oxydations. En effet, l'oxygène induit la production d'EROs, majoritairement issue de l'activité de la chaîne respiratoire localisée dans la mitochondrie. Au niveau cellulaire, les EROs sont des molécules de signalisation en quantité physiologique, mais à fortes concentrations, elles s'avèrent toxiques. En effet, un déséquilibre entre la production de radicaux libres et l'activité des défenses antioxydantes endogènes (glutathion, superoxyde dismutase, Coenzyme Q<sub>10</sub>,...) génère un stress oxydant à l'origine de l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN, responsable de diverses pathologies (cancer, diabète, maladies dégénératives). Un traitement à base d'antioxydants semble donc constituer une voie efficace de prévention contre le stress oxydant. Cependant, la perméabilité de la membrane cellulaire est une étape limitante pour l'efficacité d'une molécule. En effet, les molécules polaires diffusent peu à travers les membranes plasmiques. La lipophilie d'une molécule est donc un paramètre clé à prendre en compte (Liu *et al.*, 2011). La manière d'administrer une molécule polaire fait l'objet de nombreuses recherches. L'une des premières stratégies développées a été de véhiculer la molécule active à l'aide de liposomes ou dans des micelles, mais leur dégradation (peroxydation lipidique) peut générer sa libération prématurée (Grit and Crommelin, 1993). Pour contourner cette difficulté, d'autres approches ont été envisagées récemment comme l'enrobage du liposome par un polymère (Allen and Cullis, 2004). Une autre voie prometteuse est en cours d'exploration ; elle consiste à greffer directement le vecteur lipidique sur l'antioxydant. Ce procédé dit de lipophilisation a été expérimenté sur des composés phénoliques. En effet, Laguerre *et al.* (2011) ont ainsi vérifié si les chlorogénates d'alkyle, préalablement testés dans des émulsions, avaient le même pouvoir antioxydant au niveau cellulaire. Ces auteurs ont indiqué obtenir le même effet non linéaire ou effet «cut-off». Bien que l'effet «cut-off» soit expliqué en émulsion, son existence en culture cellulaire n'a pas encore été clairement élucidée. La compréhension de la relation lipophilie-activité antioxydante sur système cellulaire a donc été notre principal objectif.

Dans ce contexte, pour vérifier l'efficacité de la lipophilisation, un nouvel antioxydant a été sélectionné : l'acide rosmarinique. En effet, il est décrit comme étant le plus efficace parmi les acides hydroxycinnamiques (Soobrattee *et al.*, 2005). Cette molécule possède un large spectre d'activités incluant des effets antioxydants,

antibactériens et anti-inflammatoires. Elle semble également avoir un rôle préventif pour des pathologies telles que le diabète (Tavafi *et al.*, 2011), les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives (Hamaguchi *et al.*, 2009).

Pour améliorer la diffusion d'un composé phénolique, les vecteurs lipidiques utilisés sont généralement des lipides entrant dans la composition des membranes ou des lipoprotéines à basse densité. Ainsi, pour évaluer l'impact de la lipophilisation sur l'activité de l'acide rosmarinique, notre premier objectif a été de synthétiser deux types de dérivés de cette molécule : des rosmarinates d'alkyle et des rosmarinates de diacylglycérol. Par la suite, nous avons mesuré l'activité antioxydante de ces deux séries de phénolipides en évaluant leur capacité à piéger les EROs sur des fibroblastes humains modifiés. Nous avons ainsi identifié et sélectionné le meilleur vecteur lipidique pour ensuite étudier comment le type de lipophilisation effectué sur la molécule bioactive (longueur de chaîne greffée) pouvait moduler sa cinétique de franchissement membranaire ainsi que son activité dans le milieu cytoplasmique.

En effet, in cellulo, les aptitudes antioxydantes d'une molécule ne sont pas seulement dictées par leur propriété à piéger les EROs mais également par leur capacité à franchir la membrane plasmique, leur localisation intracellulaire et leur cytotoxicité. Par conséquent, nous nous sommes attachés à résoudre le mécanisme d'action des dérivés de l'acide rosmarinique en considérant ces différents paramètres. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur le transport de l'acide rosmarinique et de sa localisation intracellulaire a d'abord été déterminée par microscopie confocale. Puis, la cytotoxicité de ces molécules a été estimée par cytométrie de flux.

Ce manuscrit comporte trois chapitres. Le premier est une étude bibliographique introduisant le concept du stress oxydant. Les sources des radicaux libres et leurs conséquences biologiques sont abordées dans un premier temps. Les antioxydants endogènes et exogènes, et plus particulièrement les polyphénols, sont ensuite présentés. Puis, la lipophilisation des composés est détaillée dans trois systèmes : les émulsions, les liposomes et les cellules. Le second chapitre décrit les techniques utilisées pour la synthèse des dérivés lipidiques, pour le dosage des espèces radicalaires de l'oxygène, pour la localisation intracellulaire des phénolipides et pour la mesure de leur cytotoxicité ainsi que de leur propriété

d'agrégation. Le dernier chapitre est consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et à leur discussion. La première partie concerne la synthèse des phénolipides. La seconde regroupe l'évaluation du potentiel antioxydant des rosmarinales d'alkyle et des rosmarinales de diacylglycérol. Enfin, la dernière partie se focalise sur le mécanisme d'action des rosmarinales d'alkyle, caractérisé par leur capacité à traverser la membrane plasmique, leur localisation et leur cytotoxicité.

Enfin ce mémoire se clôt classiquement par une conclusion soulignant les principaux résultats obtenus au cours de ses travaux ainsi que les perspectives d'études qui en découlent.

# **Chapitre I : Etude bibliographique**

## Partie I : Stress oxydant

L'aspect inexorable du vieillissement a attiré de tout temps l'attention des scientifiques et philosophes des différentes civilisations. Les progrès récents en biologie ont conduit à l'élaboration de deux théories susceptibles de mieux comprendre la genèse d'une diminution progressive de la fonctionnalité des cellules et tissus. Selon Toussaint et Remacle (1994), les processus du vieillissement seraient essentiellement contrôlés par le génome nucléaire. La seconde, initiée dès 1956 par Harman (1956), postule qu'une accumulation progressive d'espèces radicales de l'oxygène (EROs) produites en grande partie par les mitochondries surviendrait au cours de la vie et endommagerait l'organite. Une telle diminution de la fonctionnalité des mitochondries induirait à la fois des déficiences métaboliques et une production additionnelle d'EROs. Ces molécules endommageraient également les protéines et membranes cellulaires, et engendreraient des mutations et délétions dans le génome nucléaire. Un tel processus pourrait à la fois expliquer la fréquence d'apparition de certaines pathologies avec le vieillissement telles que les maladies dégénératives ou certains cancers, et le vieillissement lui-même. Depuis deux décennies, cette théorie a généré un intérêt grandissant pour le rôle des espèces radicalaires de l'oxygène dans l'apparition de certaines pathologies notamment associées à des déficiences métaboliques. En 1991, Sies (1991) définit le stress oxydant comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et l'efficacité du système de défense antioxydant. Il peut survenir suite à une augmentation importante de la production d'EROs ou à une diminution des défenses antioxydantes. La chaîne respiratoire mitochondriale et la NADPH oxydase constituent les deux principales sources d'EROs. Cependant, la xanthine oxydase peut également contribuer de manière non négligeable à cette production.

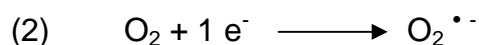
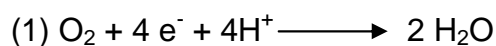
La production d'EROs peut être augmentée par différents facteurs environnementaux comme les rayons UV, la pollution mais aussi lors de l'inflammation au cours d'une activité physique intense ou une alimentation pauvre en fruits et légumes. Ainsi, une concentration très importante d'EROs non maîtrisée par l'organisme peut induire des dommages cellulaires impliqués dans de nombreuses pathologies. Par exemple, l'oxydation des lipides favorise les risques de maladies cardiovasculaires alors que la dégradation de l'ADN (acide

désoxyribonucléique) peut conduire au développement de cancers (Aruoma, 1998). Toutefois, les EROs ont une dualité d'action. Parallèlement au stress oxydant généré lorsque leur production excède largement leur dégradation par les systèmes antioxydants, les EROs sont, en quantité modérée, de véritables seconds messagers (Magder, 2006). Ils interviennent dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, l'apoptose, ou au cours de l'inflammation (Gulbins *et al.*, 2003; Seyer *et al.*, 2006; Seyer *et al.*, 2011).

Après un bref rappel des différentes EROs et de leurs sources potentielles, nous aborderons plus en détails l'implication de la mitochondrie dans le stress oxydant et les conséquences des dommages oxydatifs sur l'organisme.

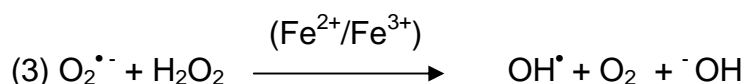
## 1 Les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs)

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules ou des atomes possédant un électron non apparié sur leur couche périphérique, ce qui leur confère une grande réactivité. Ces radicaux libres auront toujours tendance à remplir leur orbitale en captant un électron. Ce sont donc pour la plupart de puissants oxydants. Dans la cellule, ils sont notamment générés au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet la mitochondrie fournit 90% de l'énergie nécessaire à la cellule (Rolfe and Brown, 1997), et utilise 80% de la consommation d'oxygène de cette dernière. Cependant, au cours de la réduction de l'oxygène en eau (réaction 1), 1 à 2% de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Koppenol, 2001). L'anion superoxyde est le premier radical libre formé (réaction 2), ce qui conduit par la suite à la production d'autres EROs comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le radical hydroxyle ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), des dérivés nitrés ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Leurs instabilités et leurs réactivités peuvent alors induire une dégradation des protéines, de l'ADN, l'oxydation des lipides, l'ensemble de ces phénomènes étant alors à l'origine de divers désordres biologiques associés à certaines maladies. Leurs descriptions et leurs productions seront détaillées dans les chapitres suivants.

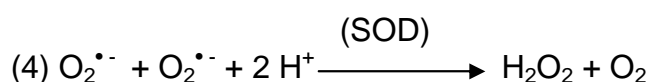


## 1.1 Radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ )

Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, notamment par les cellules phagocytaires au cours d'une attaque virale ou bactérienne. Parmi les radicaux libres, il est celui qui a la réactivité la plus faible vis-à-vis des substrats bio-organiques puisqu'il ne réagit ni avec les acides nucléiques, ni avec les protéines, ni avec les lipides en solutions aqueuses (Bielski *et al.*, 1985). L'hypothèse la plus souvent proposée est celle d'une toxicité indirecte. En effet, la génération d'espèces secondaires est plus dommageable que celle du radical superoxyde. Ainsi, d'après la réaction de Haber-Weiss (1934) qui nécessite la présence de cations métalliques comme catalyseur, l'anion superoxyde est transformé en radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) beaucoup plus réactif (réaction 3).

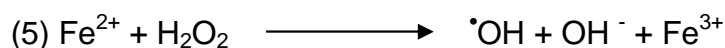


Par ailleurs, l'anion superoxyde est également réduit en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD) (réaction 4). Cette molécule est plus stable mais diffuse plus rapidement. Elle peut réagir avec les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), via la réaction de Fenton, pour être transformée à son tour en radical hydroxyle dont la toxicité est plus importante.



## 1.2 Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )

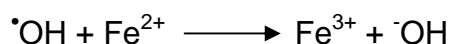
Le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  est principalement produit à partir de  $H_2O_2$  via la réaction de Fenton (réaction 5) :



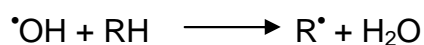
L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour conduire à la formation du radical hydroxyle qui s'avère être un oxydant puissant doté de la vitesse de réaction la plus rapide ( $\approx 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{S}^{-1}$ ) (Buxton *et al.*, 1988). Ainsi, il réagit avec l'ensemble des molécules de l'organisme selon trois modes d'action :



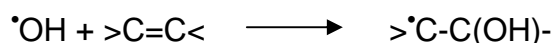
(i) Arrachement d'un électron :



(ii) Arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique (RH) :



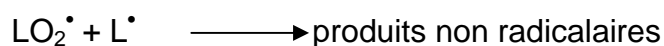
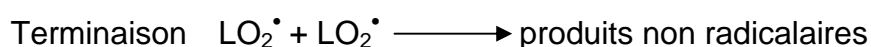
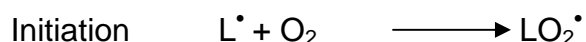
(iii) Addition sur une double liaison



Les deux derniers modes d'action, qui conduisent à la formation de radicaux centrés sur le carbone, affectent la guanine (base purique de l'ADN) et l'acide linoléique (acide gras polyinsaturé de la famille des omégas 6). Le radical hydroxyle peut ainsi générer la peroxydation lipidique (Gutteridge, 1995) et altérer l'intégrité de l'ADN (Cadet *et al.*, 2002).

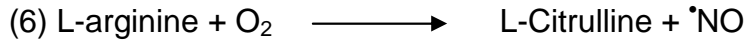
### 1.3 Radicaux peroxydes

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires, formés lors de l'interaction des radicaux hydroxyles avec les acides gras polyinsaturés (AGPIs). Cette réaction en chaîne, située au niveau de la membrane plasmique, est connue sous le nom de peroxydation lipidique. Elle se déroule en trois étapes : initiation, propagation, terminaison. Le radical hydroxyle capte un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique des AGPIs pour former un radical alkyle ( $\text{L}\cdot$ ) qui réagit avec l'oxygène pour former le radical peroxyde ( $\text{LOO}\cdot$ ). L'étape de propagation consiste en une réaction entre le radical alkyle et les autres AGPIs pour former un autre radical alkyle. Le radical peroxyde peut également réagir avec les AGPIs pour former un hydroxyperoxyde ( $\text{LOOH}$ ) et à nouveau un radical alkyle.



## 1.4 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ( $\text{NO}$ ) est une molécule labile synthétisée à partir de la L-arginine (réaction 6), acide aminé essentiel pour la synthèse des protéines.



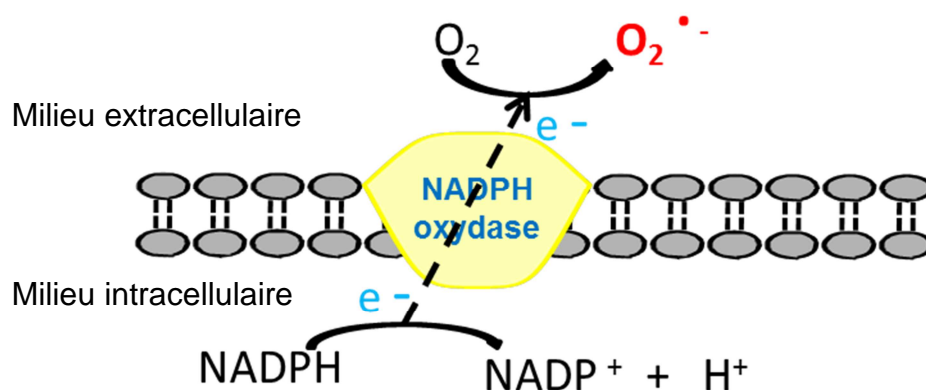
Dans les conditions physiologiques, le monoxyde d'azote ( $\text{NO}$ ) présente à la fois des propriétés régulatrices et cytotoxiques en fonction de son site de production et de la quantité produite. A titre d'exemple, suite à une augmentation du débit sanguin, le monoxyde d'azote est produit en faibles quantités par la NO synthétase des cellules endothéliales. Sa libération génère une cascade de réactions, libérant la guanosine monophosphate responsable de la vasodilatation (Cohen, 2000). En parallèle, il peut également limiter l'effet vasoconstricteur de la noradrénaline. Le monoxyde d'azote joue donc un rôle essentiel dans le contrôle du système cardiovasculaire (Guimaraes and Moura, 2001). Le monoxyde d'azote peut également avoir un rôle préventif contre la peroxydation lipidique en favorisant les réactions de terminaisons. En effet, il réagit rapidement avec les radicaux peroxy ( $\text{RO}^\bullet$ ) ou alkylperoxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) pour former un alkylperoxynitrite ( $\text{ROONO}$ ) qui stoppe la peroxydation lipidique, et limite ainsi les lésions oxydatives provoquées par les EROs (Grisham *et al.*, 1999). Par contre, le monoxyde d'azote interagit rapidement avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite ( $\text{OONO}$ ). Ce dernier diffuse largement au travers des membranes et peut endommager les protéines, les lipides et les acides nucléiques. De plus, il peut également induire la S-nitrosylation du glutathion réduit dont la biodisponibilité est alors diminuée. La cellule perd alors une grande partie de ses capacités antioxydantes (Kroncke *et al.*, 2000).

## 1.5 La double vie des espèces réactives de l'oxygène

En conditions physiologiques, les EROs sont présentes dans les cellules à des concentrations faibles. Leurs taux de production et d'élimination sont régulés par des systèmes antioxydants de nature enzymatique ou non. En raison de leur grande réactivité vis-à-vis des protéines et des lipides, les EROs peuvent endommager certaines fonctions cellulaires. Cependant, comme le souligne Dröge (2002), les radicaux libres contrôlent également de nombreuses fonctions cellulaires. En effet,

les EROs, en particulier le peroxyde d'hydrogène, sont des messagers secondaires impliqués dans diverses cascades de signalisation. Elles agissent sur l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation en activant ou en inhibant des facteurs de transcription tels que  $\text{NF}_\kappa\text{B}$  (nuclear factor  $\kappa\text{B}$ ) ou AP-1 (Activator protein 1) (Swain *et al.*, 2002 ; Stone and Yang, 2006). A titre d'exemple, le facteur transcriptionnel  $\text{NF}_\kappa\text{B}$  impliqué dans la réponse immunitaire est maintenu dans le cytoplasme lorsqu'il est associé à la protéine *I* $\kappa\text{B}$ . La phosphorylation d'*I* $\kappa\text{B}$  induite par les EROs entraîne sa dégradation libérant  $\text{NF}_\kappa\text{B}$ . Ce dernier est transloqué dans le noyau et peut ainsi réguler l'expression des gènes de l'inflammation. Une seconde régulation pourrait être générée par les EROs au niveau du domaine de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription qui comporte une cystéine. En effet, le groupement thiol oxydé par les EROs inhibe l'activité transcriptionnelle de  $\text{NF}_\kappa\text{B}$  (Claiborne *et al.*, 1993). Il y a donc deux niveaux antagonistes de régulation de  $\text{NF}_\kappa\text{B}$  : l'un s'opère au niveau de la translocation nucléaire de la protéine, l'autre au niveau de sa fixation à l'ADN (Anderson *et al.*, 1994). Les EROs semblent donc à l'origine d'une boucle de régulation de la voie  $\text{NF}_\kappa\text{B}$  comportant un rétro-contrôle dont les modalités restent en grande partie à préciser.

L'activation de la NADPH oxydase phagocytaire constitue un second exemple du rôle positif des EROs. Cette enzyme transfère des électrons du NADPH cytosolique vers une molécule d'oxygène. Ceci engendre la formation d'anions superoxydes hautement toxiques pour les agents pathogènes (**figure 1**).



**Figure 1 : Production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase des cellules phagocytaires**

Les EROs interviennent plus généralement dans la régulation de l'expression des gènes et de certains facteurs transcriptionnels (Finkel, 2001 ; Finkel, 2003) impliqués dans le développement et la progression des tumeurs (Storz, 2005) ou de l'angiogenèse (Valko *et al.*, 2006). Ces molécules sont également fortement impliquées par leur action toxique dans la lutte contre des bactéries résistantes aux enzymes protéolytiques (Babior, 2000).

Ainsi, en quantités restreintes ou confinés à un type cellulaire (phagocytes), les radicaux libres constituent des molécules de signalisation impliquées dans l'homéostasie cellulaire et les processus immunitaires. Cependant, leur accumulation prolongée dans les tissus peut s'avérer toxique, phénomène connu sous le nom de stress oxydant.

## 2 Origine cellulaire des espèces réactives de l'oxygène

Le précurseur des espèces réactives de l'oxygène est l'anion superoxyde produit au niveau du complexe enzymatique mitochondrial. Les EROs peuvent être également produites par la NADPH oxydase (Babior, 2000), la xanthine oxydase, les lipoxigénases, les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P<sub>450</sub>) (Halliwell, 2009). Une production très importante d'EROs non contrôlée par l'organisme engendre des dommages de l'ADN, des protéines et l'oxydation des lipides (**figure 2**).

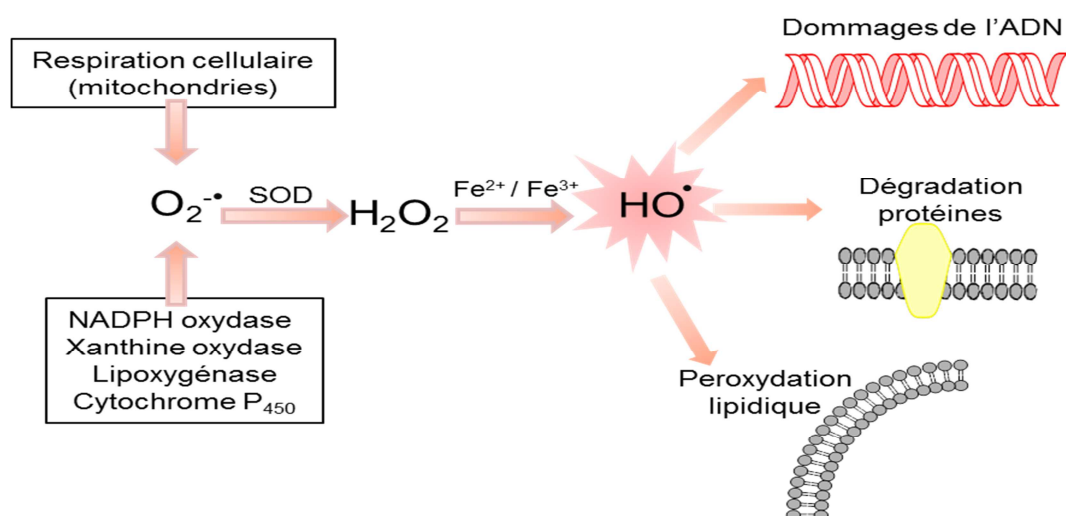
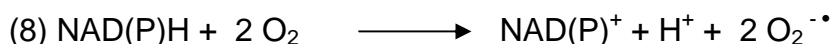


Figure 2 : Stress oxydatif induit par la production d'EROs exogènes et/ou endogènes

## 2.1 Origines enzymatiques des EROs

### 2.1.1 NADPH oxydase

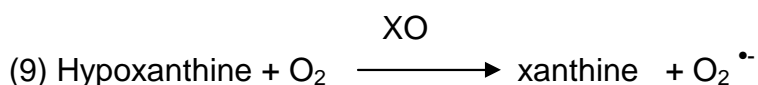
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène dans laquelle le NADPH ou NADH sont des donneurs d'électrons (réaction 8) :



La NAD(P)H oxydase, présente dans tous les types cellulaires, est localisée sous sa forme active dans la membrane plasmique. Dans les cellules phagocytaires, lors d'une agression virale ou bactérienne, la NAD(P)H oxydase produit une quantité élevée d'anions superoxydes à l'extérieur de la cellule, alors que dans les cellules non phagocytaires, ils sont libérés à l'intérieur de la cellule (Souza *et al.*, 2001). Ainsi, selon le type cellulaire, l'anion superoxyde peut être transféré hors de la cellule ou conservé dans le cytoplasme. Dans le dernier cas, il est dismuté en peroxyde d'hydrogène, lui-même transformé en radical hydroxyle (plus réactif) via la réaction de Haber-weiss catalysée par le couple redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ .

### 2.1.2 Xanthine oxydase

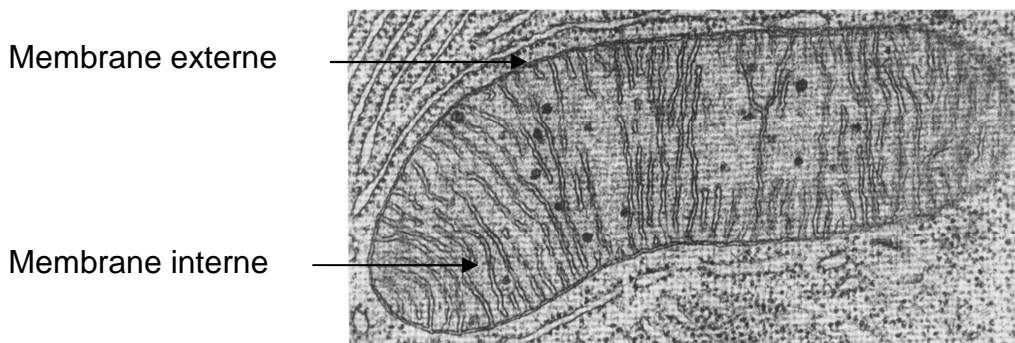
La xanthine oxydo-réductase (XOR) est une molybdo-enzyme, connue sous deux formes : la xanthine déshydrogénase (XDH), prédominante *in vivo*, et la xanthine oxydase (XO). Ces deux enzymes se différencient par leur type de substrats. La XDH permet la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}_2$ , alors que la XO utilise l'oxygène moléculaire au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine. Dans les deux cas, la réduction de l'oxygène par la XDH ou la XO conduit à la formation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (réaction 9). L'anion superoxyde est réduit en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD), ce dernier étant à l'origine des radicaux hydroxyles.



## 2.2 La mitochondrie

### 2.2.1 La source énergétique de la cellule

Les mitochondries sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Elles se composent d'une membrane externe et interne délimitant deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice délimitée par la membrane interne, très plicaturée qui forme les crêtes caractéristiques de la structure interne des mitochondries (**figure 3**).



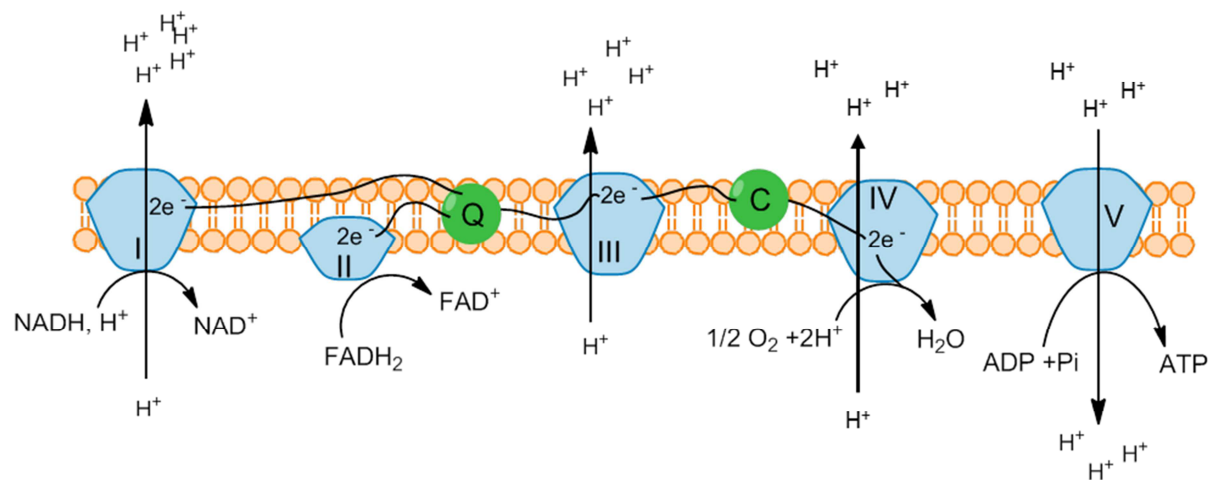
**Figure 3 : Microscopie électronique d'une mitochondrie**

Le rôle physiologique des mitochondries est fondamental dans les cellules eucaryotes. A partir de l'oxydation complète des nutriments via le cycle de Krebs (glucides, lipides, protéines), elles produisent de l'énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La dégradation oxydative des nutriments aboutit à la formation de coenzymes réduits ( $\text{NADP, H}^+$ ) et de flavonoïdes réduits ( $\text{FADH}_2$ ). Sur la chaîne respiratoire située sur la membrane interne, les coenzymes réduits cèdent leurs électrons au profit des complexes enzymatiques mitochondriaux jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène.

A ce transport d'électrons est associé un transfert actif de hydrogènes de la matrice vers l'espace intermembranaire générant une force protomotrice. Ce gradient de protons est utilisé par l'ATP synthétase pour synthétiser l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). L'ATP ainsi formé dans la matrice mitochondriale est transporté vers le cytosol à l'aide des ANTs (adenine nucleotide translocase) qui permettent également l'entrée d'ADP cytosolique dans la mitochondrie (Klingenberg *et al.*, 1978).

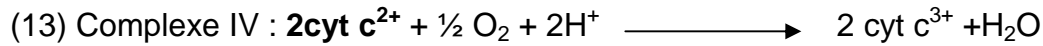
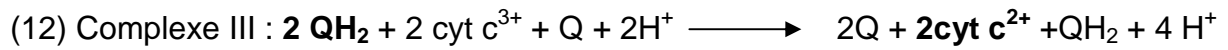
La chaîne respiratoire comprend cinq complexes (**figure 4**) :

- La NADH ubiquinone oxydoréductase = complexe I
- La succinate ubiquinone oxydoréductase = complexe II
- L'ubiquinol cytochrome C réductase = complexe III
- La cytochrome C oxydase = complexe IV
- L'ATP synthase = complexe V



**Figure 4 : Chaîne respiratoire mitochondriale**

Le complexe I oxyde le NADPH et transfère ses électrons à l'ubiquinone (coenzyme Q ou Q) pour former l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>) (réaction 10). La libération de deux électrons s'accompagne d'une perte de deux protons à l'extérieur de la matrice. Le complexe II est la seconde voie d'entrée d'électrons dans la chaîne respiratoire. Il est également impliqué dans le cycle de Krebs. L'oxydation du succinate en fumarate nécessite la participation du co-facteur FADH, H<sup>+</sup> qui cède à son tour deux électrons captés par l'ubiquinone (réaction 11). Cependant, l'activité de ce complexe est la seule à ne pas être couplée à un transfert de protons. Le complexe III oxyde l'ubiquinol, et transfère les électrons au complexe IV via un transporteur mobile : le cytochrome C (cyt C) (réaction 12). Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydo-réduction, accepte les électrons du cytochrome C, et les cède à l'accepteur final, l'O<sub>2</sub>, qui est réduit en H<sub>2</sub>O (réaction 13).



Le gradient de protons généré par les complexes I, III et IV permet un retour facilité des protons vers la matrice mitochondriale via le complexe V. L'énergie apportée par la diffusion des protons permet à l'ATP synthétase de phosphoryler l'ADP en ATP. Ces réactions sont désignées sous le nom de phosphorylations oxydatives. Ainsi, la mitochondrie est un organite cellulaire essentiel au métabolisme énergétique de l'organisme.

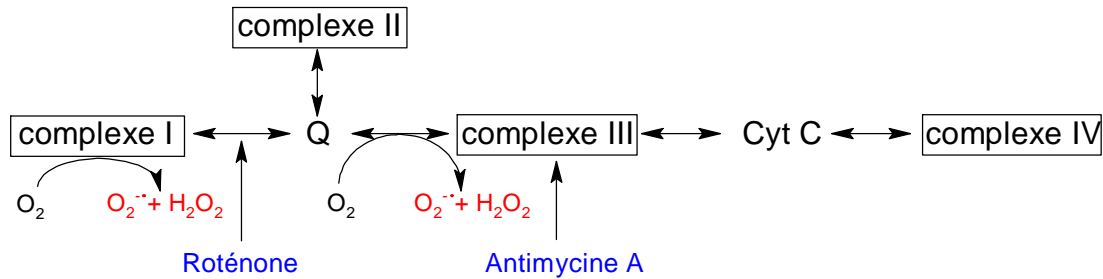
### 2.2.2 La mitochondrie, une source majeure d'anions superoxydes

Pendant l'activité phosphorylante, 1 à 2% de l'oxygène ne sont pas réduits en eau et sont transformés en anion superoxyde (Cadenas and Davies, 2000). Compte-tenu de l'intensité de l'activité mitochondriale, la production d'anions superoxydes mitochondriaux est considérée comme la principale source d'EROs.

Les premières observations identifiant la production d'EROs dans la mitochondrie ont été réalisées par Jensen (1966). Par la suite, de nombreux travaux ont confirmé l'implication des mitochondries dans la production d'anions superoxydes (Murphy, 2009). En effet, l'inhibition du complexe I par la roténone ou celle du complexe III par l'antimycine A élève considérablement la production cellulaire d'anions superoxydes (Turrens and Boveris, 1980 ; Turrens, 2003 ; Muller *et al.*, 2004) (**figure 5**). Muller *et al.* (2004) ont montré que l'anion superoxyde produit au niveau de complexe III était libéré de chaque côté de la membrane interne. Selon Liu *et al.* (2002), le complexe I constituerait la source majoritaire d'anions superoxydes. Cependant, des différences tissulaires dans la participation relative des complexes I et III ont été rapportées. En effet, le complexe III a été impliqué majoritairement dans



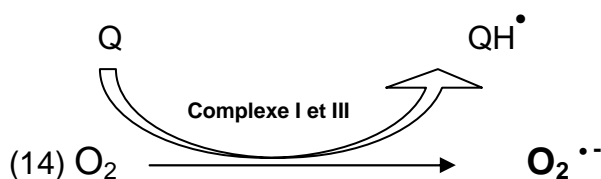
la production d'anions superoxydes dans le cœur et les poumons (Turrens *et al.*, 1982). Le complexe I constituerait la principale source dans les mitochondries du cerveau (Barja, 1999), et serait impliqué dans certaines pathologies telles que la maladie de Parkinson (Nicholls, 2002; Sherer *et al.*, 2003). Enfin, la monoamine oxydase, localisée dans la membrane mitochondriale externe, pourrait participer à une telle production (Cadenas and Davies, 2000).



**Figure 5 : Production d'anions superoxydes après une inhibition du complexe I par la roténone et du complexe III par l'antimycine A**

La production d'anions superoxydes peut être également induite par un flux inverse d'électrons issus de l'oxydation du  $FADH, H^+$  du complexe II. Les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I et réduire le  $NAD^+$  en  $NADH$ , favorisant ainsi la production d'anions superoxydes (Liu *et al.*, 2002).

La capacité de l'ubiquinone à transférer ses électrons au cytochrome C semble être très probablement impliquée dans la formation mitochondriale d'EROs. En effet, Au niveau du complexe I, le co-facteur FMN (Flavine MonoNucléotide) accepte les deux électrons cédés par le  $NADH, H^+$  pour réduire l'ubiquinone. Cependant, un électron peut être capté par l'oxygène et générer ainsi l'anion superoxyde (réaction 14).



La production d'EROs par le complexe I se situe uniquement dans la matrice mitochondriale alors que celle du complexe III s'opère à la fois côté matriciel et vers l'espace intermembranaire. Au niveau du complexe III, le coenzyme Q est réduit dans la membrane interne en ubiquinol. Si un seul électron est transféré au cytochrome C, un radical  $\text{QH}^\bullet$  se forme. Dans ce cas, le second électron peut être transféré à l'oxygène pour former l'anion superoxyde.

### 2.2.3 Les EROs peuvent altérer l'activité mitochondriale

La localisation mitochondriale de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) à l'intérieur de la mitochondrie est très majoritaire. En effet, contrairement au peroxyde d'hydrogène, il diffuse peu à travers les membranes mitochondriales, et est présent dans la matrice et dans l'espace intermembranaire en raison des activités des complexes I et III (Muller *et al.*, 2004). Dans la matrice mitochondriale,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  peut provoquer directement des dommages sur l'ADN mitochondrial (ADNm), les protéines et les lipides.

L'ADN mitochondrial est très sensible à l'oxydation. Contrairement à l'ADN nucléaire, il n'est pas protégé par des histones, bien que le facteur de transcription et de réplication A (Tfam) du génome mitochondrial semble jouer un rôle similaire à celui des histones (Clayton, 1991). Par ailleurs, les mécanismes de réparation de l'ADNm semblent moins performants que ceux intervenant au niveau du noyau. En effet, le principal marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN, la 8-oxo-2'desoxyguanosine (8-oxo-dG), est dix fois plus important dans l'ADNm que dans l'ADN nucléaire (Richter *et al.*, 1988). Ces dommages s'accumulent au cours du vieillissement. En effet, entre 6 et 24 mois, une augmentation de la 8-oxo-dG de 50% et 70% a été démontrée chez la souris et le rat (Hamilton *et al.*, 2001).

Les protéines mitochondriales situées sur la membrane interne sont également la cible de l'anion superoxyde. Ainsi, l'oxydation de l'ANT perturbe la synthèse d'ATP. De plus, l'anion superoxyde peut être converti en peroxyde d'hydrogène par la MnSOD présente dans la matrice mitochondriale. En présence de métaux,  $\text{H}_2\text{O}_2$  est converti en radical hydroxyle via la réaction de Fenton. Ce dernier réagit rapidement avec les cardiolipines, constituants principaux des membranes mitochondriales. Leur peroxydation affecte non seulement l'activité de la chaîne

respiratoire et de diverses déhydrogénases, mais aussi la libération du cytochrome C dans le cytoplasme qui déclenche la cascade d'événements conduisant à l'apoptose (Chen and Yu, 1994; McMillin and Dowhan, 2002). Ainsi, une production importante d'EROs par les mitochondries est susceptible d'altérer gravement leur activité et d'induire la mort cellulaire programmée.

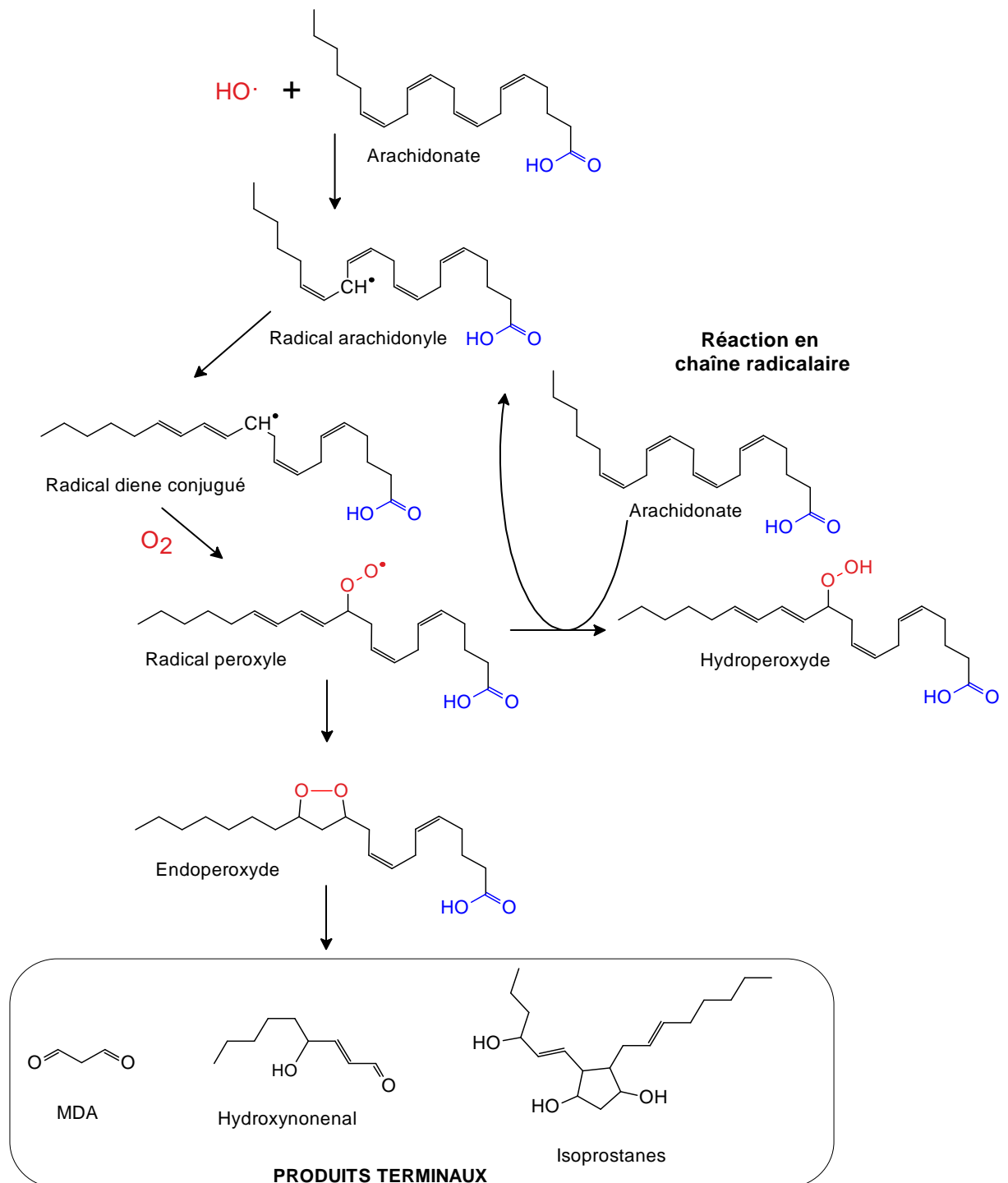
### 3 Dommages induits par le stress oxydatif

Dans les conditions physiologiques, il existe un équilibre entre la production d'EROs et leur dégradation liée aux défenses antioxydantes. Cependant, dans certaines conditions nutritionnelles ou environnementales, cet équilibre est rompu et génère un stress oxydant (Sies, 1986). Ce déséquilibre peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, d'une activation des systèmes enzymatiques producteurs d'EROs (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase) ou des facteurs extérieurs comme le tabac, les rayons UV, la pollution ou une alimentation pauvre en fruits et légumes. Lorsque l'équilibre redox intra ou extracellulaire est perturbé, les EROs peuvent s'accumuler et provoquer des effets néfastes dont l'intensité dépend de la durée, de la quantité et de la nature du tissu considéré. L'oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques peut altérer gravement leur fonctionnalité et conduire à des pathologies graves telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose, le diabète ou les maladies cardiovasculaires (Aggarwal and Harikumar, 2009 ; Halliwell, 1991).

#### 3.1 Oxydation des lipides

L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) produit majoritairement par les mitochondries ne réagit pas directement avec les lipides. Il est le précurseur des radicaux hydroxyles ( $HO^{\bullet}$ ) et hydroperoxydes ( $HO_2^{\bullet}$ ) lorsqu'il réagit avec une molécule d'eau. Les acides gras polyinsaturés (AGPIs) présents dans les phospholipides, les sphingolipides et les cardiolipines sont des cibles majeures de ces molécules. La peroxydation lipidique peut être stoppée par un donneur d'hydrogène tels que la vitamine E (Atkinson *et al.*, 2010). Les hydroperoxydes formés sont réduits par la glutathion peroxydase en acides gras monohydroxylés. Cependant, au cours du vieillissement,

la synthèse de cette enzyme diminue et la production d'EROs augmente. Il en résulte une dégradation des hydroperoxydes en produits toxiques. Par exemple, l'acide arachidonique se décompose en isoprostane et autres produits comme le malondialdéhyde (MDA) (**figure 6**) (Esterbauer *et al.*, 1991).



**Figure 6 : Réactions de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés et les produits d'oxydation**

Les conséquences de la peroxydation lipidique sont nombreuses. Les hydroperoxydes formés sont instables. Ainsi, l'accumulation de malondialdéhydes, ou du 4-hydroxynonémal (4-HNE) est susceptible de former des adduits sur les groupements  $\text{NH}_2$  des protéines et engendrer des dommages sur l'ADN (Marnett, 1999) (Bartsch and Nair, 2006).

La peroxydation lipidique concerne également les lipoprotéines à faible densité (LDL), riches en AGPIs, triacylglycérols et en cholestérol. Les cellules endothéliales constituent une cible importante des LDLs oxydées. L'oxydation de ces derniers engendre en effet une réaction inflammatoire locale. Les LDLs oxydées sont captées par les macrophages qui participent à la constitution de la plaque d'athérome et à la génération des maladies cardiovasculaires (Harrison *et al.*, 2003 ; Matsuura *et al.*, 2008).

Le cholestérol non estérifié représente une autre cible. Lors d'une oxydation, il se transforme en oxystérol, molécule impliquée dans les cancers cutanés (Yamazaki *et al.*, 1999).

Ainsi, l'oxydation des lipides par les EROs est considérée comme un facteur important impliqué dans le développement de pathologies graves telles que les cancers, les maladies inflammatoires, l'athérosclérose (McMillin and Dowhan, 2002).

### 3.2 Dommage sur l'ADN

Il est bien établi que le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) réagit avec les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (Dizdaroglu *et al.*, 2002). Les dommages qui en résultent sont la formation de bases oxydées, de sites abasiques, d'adduits dérivés de l'oxydation lipidique, de cassures de brins et de pontages ADN-protéines (**figure 7**) (Cadet *et al.*, 2002). Le radical hydroxyle peut en effet rompre la liaison entre le désoxyribose et la base, entraînant la rupture de la chaîne simple brin. Dans le cas des bases oxydées, la guanine est oxydée en 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine. Elle ne s'apparie plus avec l'adénine (base purique) mais avec la cytosine (base pyrimidique), ceci aboutit à une mutation de transversion (Cooke *et al.*, 2003). De plus, la réaction entre les acides nucléiques et les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique conduit à la formation d'adduits comme par exemple celui entre le MDA et la guanine. La

présence de cet adduit MDA-ADN a été détectée de manière significative chez des patients atteints de cancer (Wiseman and Halliwell, 1996). Ainsi, un stress oxydant très important, susceptible d'induire des anomalies de réplication et/ou de transcription de l'ADN ou une anomalie dans le système de réparation de l'ADN, peut être impliqué dans les processus d'oncogenèse.

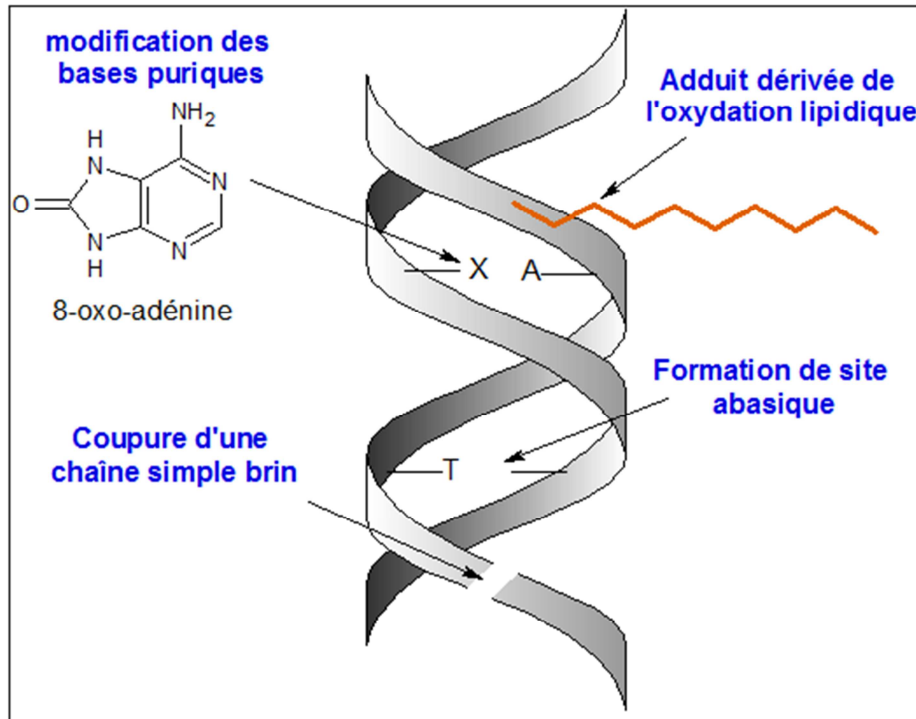


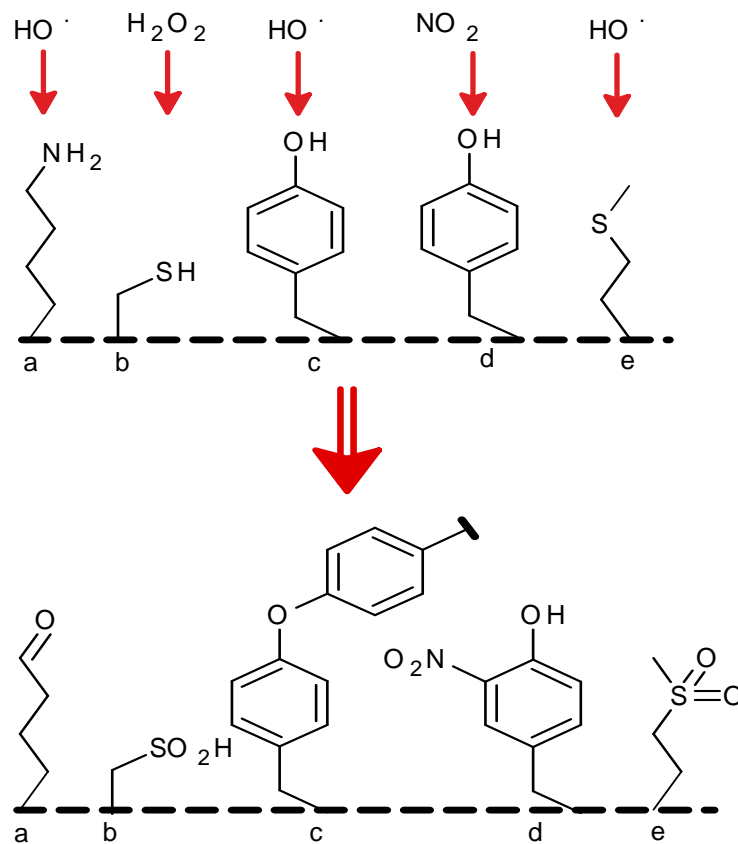
Figure 7 : Dommage sur l'ADN après une attaque radicalaire

### 3.3 Oxydation des protéines

Les dommages provoqués par les EROs sur les protéines sont de plusieurs types. La nitration, l'oxydation des groupements sulfure, la formation d'aldéhyde, la formation de liaison intra ou inter chaînes sont représentées sur la **figure 8**.

L'oxydation des acides aminés peut induire le repliement des protéines et modifier profondément leur activité ou provoquer la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Dalle-Donne *et al.*, 2006). A titre d'exemple, l'interaction des EROs avec les fonctions thiols des cystéines conduit à la formation de ponts disulfures. Cependant, cette altération est réversible car les fonctions thiols peuvent être régénérées par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. Cette modification joue

un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Dean *et al.*, 1997).



**Figure 8 : Oxydation des acides aminés après différents types d'attaque radicalaire : a) oxydation de la lysine, b) oxydation d'une fonction thiol de la cystéine, c) liaison inter ou intra moléculaire de la tyrosine, d) nitration tyrosine, e) oxydation méthionine (d'après Favier, 2003)**

Par ailleurs, les produits d'oxydations des AGPIs tels que le MDA ou le 4-HNE forment des adduits sur les groupements amines des acides aminés. A la différence des EROs, ces aldéhydes sont des composés stables et diffusent facilement à travers les membranes pour atteindre leurs cibles (protéines, ADN). Ainsi, ces produits secondaires, issus de la peroxydation lipidique, sont des acteurs importants du stress oxydant, y compris en quantités modérées compte-tenu de leur stabilité. Ils affectent plusieurs voies de signalisations, notamment impliquées dans la transduction du signal et la prolifération cellulaire (Uchida, 2003).

Pour la majorité des acides aminés, l'oxydation est un phénomène irréversible. Les protéines endommagées sont alors éliminées par le protéasome pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Baraibar and Friguet, 2012). Cependant, au cours du vieillissement, l'activité du complexe enzymatique du protéasome décroît, en particulier celle de la peptidyl-glutamylpeptide hydrolase impliquée dans la dégradation des protéines oxydées (Conconi and Friguet, 1997). Ces dernières étant très hydrophobes, elles s'associent aux lipides pour former des amas anormaux de lipofuscine autour des cellules. Ces dépôts, en partie liée à la décroissance de l'activité du protéasome, augmentent avec l'âge, et sont particulièrement abondants chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Stadtman, 1992).

*In fine*, Harman (1956) proposait il y a presque soixante ans sa théorie radicalaire du vieillissement. Aujourd'hui, il est admis que le stress oxydant est impliqué dans les processus complexes du vieillissement, mais aussi dans la genèse et le développement de diverses pathologies. En effet, l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN s'accroît avec l'âge sous l'influence d'une production continue d'EROs, associée à une diminution progressive des défenses antioxydantes et de la capacité de détruire les protéines oxydées (Sohal *et al.*, 2002). Par ailleurs, le stress oxydant est actuellement considéré comme un élément important impliqué dans l'apparition du diabète, de maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson et des maladies cardiovasculaires.



## Partie II : Les antioxydants

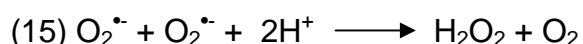
Par définition, un composé antioxydant doit être capable de retarder et d'inhiber significativement l'oxydation du substrat, et cela à de faibles concentrations par rapport à celles du substrat oxydable (Halliwell and Gutteridge, 1990). Dans l'organisme, la défense antioxydante endogène est assurée par les molécules réductrices comme le glutathion ou l'ubiquinol ou par des enzymes telles que les superoxydes dismutases, les catalases ou les peroxydases. La cellule peut également s'adapter en régulant les gènes codant pour des produits antioxydants ou pro-oxydants. Lorsque le stress induit par les EROs est supérieur aux capacités antioxydantes de la cellule, celle-ci peut initier son processus d'apoptose, évitant ainsi une toxicité générale au niveau du tissu ou de l'organisme

Dans certaines pathologies ou au cours du vieillissement, les antioxydants endogènes sont insuffisants pour contrôler le taux d'EROs et maintenir l'homéostasie redox. C'est pourquoi, l'apport d'antioxydants exogènes, apportés notamment par l'alimentation, suscite un grand intérêt dans la prévention du stress oxydant et de ses conséquences (Visioli *et al.*, 2011).

### 1 Antioxydants enzymatiques

#### 1.1 Superoxyde dismutase

L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est un radical produit par la chaîne respiratoire mitochondriale et par la NADPH oxydase. Sa dismutation en peroxyde d'hydrogène et en oxygène est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD) (réaction 15).

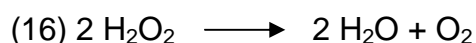


Les SODs sont des métalloenzymes qui existent sous plusieurs formes en fonction de leur localisation cellulaire (Landis and Tower, 2005). La SOD 1 est une superoxyde dismutase à cuivre et à zinc, localisée dans le cytoplasme. La SOD 2 est une superoxyde dismutase à manganèse, située dans la mitochondrie qui a un rôle crucial dans la préservation de l'activité de l'organite. Enfin, la SOD 3 est une superoxyde dismutase à cuivre et à zinc extracellulaire, détectée dans le plasma et la lymphe.

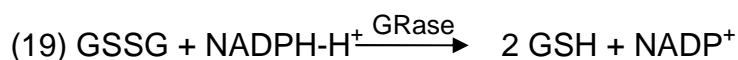
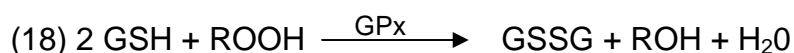
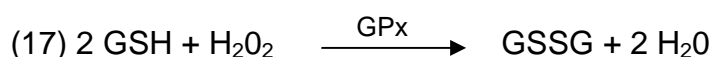
L'activité des SODs constitue la première ligne de défense. Leur rôle principal est de limiter la diffusion de l'anion superoxyde en le convertissant en produits moins réactifs ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$ ). Cependant, le peroxyde d'hydrogène généré par les SODs est notamment impliqué dans la réaction de Fenton qui produit un radical très réactif, le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ). Ainsi, le peroxyde d'hydrogène est détoxifié par une seconde ligne de défenses composée d'autres enzymes telles que la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) et le système thiorédoxine / thiorédoxine réductase.

## 1.2 Catalases et la glutathion peroxydase

La catalase est une enzyme hémique qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (réaction 16) (Ko *et al.*, 2000).



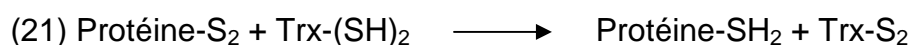
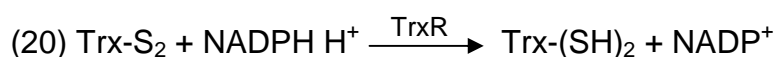
Une seconde classe d'enzymes est également impliquée dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes d'origine lipidique : la glutathion peroxydase. L'ensemble des GPx oxyde un tripeptide, le glutathion (GSH), pour réduire le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau (réaction 17) et les hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$ ) en alcools ( $\text{ROH}$ ) (réaction 18) (Michiels *et al.*, 1994). Le glutathion oxydé (GSSG) est régénéré par une autre enzyme, la glutathion réductase (GRase) dont la réaction est catalysée par le  $\text{NADPH}, \text{H}^+$  (réaction 19).



Chez les eucaryotes, on distingue cinq classes d'isoenzymes : la GPx1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmique, la GPx4 localisée à l'interface de la membrane cellulaire et du cytoplasme et la GPx5 épидидymaire. Ce pool d'enzymes est largement représenté dans tout l'organisme. Il réagit avec de nombreux substrats tels que les hydroxyperoxydes des esters de cholestérol, des phospholipides des membranes plasmiques ou des lipoprotéines, et limite ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Une diminution de l'activité enzymatique des Gpx a été observée au cours du vieillissement ou chez les sujets diabétiques, favorisant ainsi les dommages oxydatifs (Muruganandam *et al.*, 1992 ; Vericel *et al.*, 2004).

### 1.3 Le système thiorédoxine (TRX)

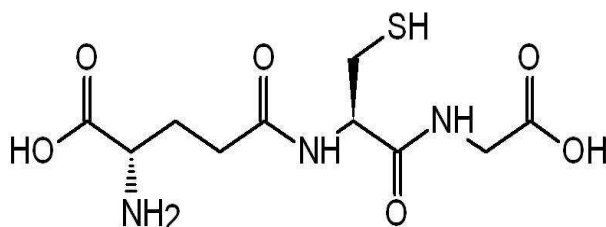
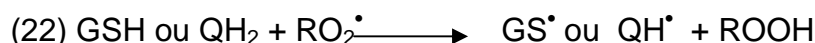
Parallèlement à la dismutation de l'anion superoxyde par les SODs, à la détoxification du peroxyde d'hydrogène par la catalase, et à la neutralisation des hydroxyperoxydes par la glutathion peroxydase, un quatrième système de défense protégeant les protéines comportant une fonction thiol a été identifiée : le système thiorédoxine. En effet, les protéines riches en soufre sont particulièrement sensibles à l'oxydation, et forment, dans ce cas, des ponts disulfures. La forme oxydée de la thiorédoxine (Trx-S<sub>2</sub>) est initialement réduite (Trx-SH<sub>2</sub>) par la thiorédoxine réductase (TrxR) sous l'influence d'un coenzyme, le NADPH (réaction 20). Trx-SH<sub>2</sub> réduit ensuite les protéines (protéine-S<sub>2</sub>) riches en ponts disulfures via la TrxR (réaction 21). Ce système thiorédoxine protège les protéines contre la formation de ponts disulfures, et participe donc au maintien de leur activité dans diverses voies de signalisation (Arner and Holmgren, 2000). De plus, la thiorédoxine permet également la régénération de la vitamine C, de l'acide lipoïque et de l'ubiquinone (Nordberg and Arner, 2001).



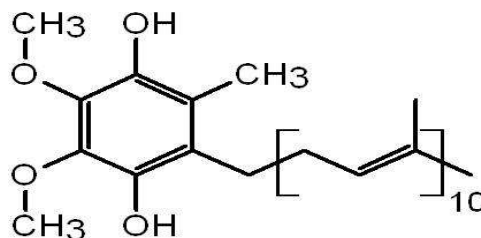
## 2 Défenses antioxydantes non enzymatiques

### 2.1 Glutathion et coenzyme Q

La régulation du stress oxydant s'effectue entre les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Contrairement aux enzymes antioxydantes qui transforment les EROs en produits moins réactifs ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$ ), les antioxydants non enzymatiques réduisent les radicaux libres en leur cédant un hydrogène (réaction 22).



Glutathion (GSH)



Coenzyme Q<sub>10</sub> ou Ubiquinol

Le glutathion (GSH) réagit avec les radicaux hydroxyles, alkoxydes et peroxydes. Cependant, la réduction de ces espèces radicalaires conduit à la formation de radicaux thiyles ( $\text{GS}^\bullet$ ), susceptibles d'initier l'oxydation des LDLs. Comme nous l'avons déjà signalé, le glutathion est également indispensable à l'activité enzymatique de la GPx.

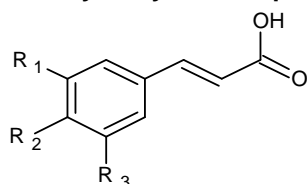
Le coenzyme Q est un composé hydrophobe, localisé au niveau de la chaîne respiratoire et dans les lipoprotéines. Il exerce à la fois un rôle de transporteur d'électrons et un rôle d'antioxydant. Sous sa forme réduite, il limite la peroxydation lipidique en réagissant directement avec les hydroperoxydes ou indirectement en régénérant la vitamine E (Beyer, 1994). L'activité antioxydante est couplée à l'activité d'une enzyme, la DT-diaphorase, qui réduit l'ubiquinone formée au cours du transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire en ubiquinol (Beyer, 1994).

## 2.2 Antioxydants exogènes : les polyphénols

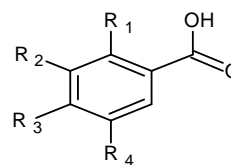
Comme nous l'avons décrit, le stress oxydant peut être induit par un dysfonctionnement des défenses antioxydantes et/ou une surproduction d'EROs. L'apport d'antioxydants dans notre alimentation est susceptible d'améliorer le niveau des défenses antioxydantes et par conséquent de prévenir l'apparition des pathologies associées au stress oxydant. A ce titre, l'utilisation d'antioxydants comme les polyphénols a été particulièrement étudiée.

### 2.2.1 Généralités

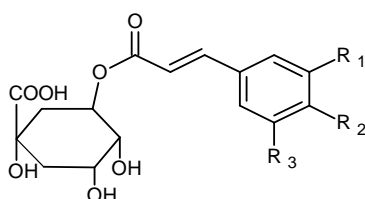
Les polyphénols sont des molécules très abondantes dans les végétaux, puisqu'environ 8000 composés appartenant à cette famille ont été identifiés. Ils ont notamment été trouvés dans de nombreux végétaux de consommation courante comme le tournesol, la pomme, les fruits citriques, le raisin, le thé vert ou le café (Ross and Kasum, 2002 ; Clifford, 1999). Le terme polyphénol est utilisé de manière générique pour désigner l'ensemble des composés phénoliques, bien que le nombre de groupements hydroxyles varie en fonction de la classe de ces composés. En effet, s'ils ont tous en commun la présence d'un cycle aromatique portant un ou plusieurs hydroxyles, leur appartenance à une classe dépend de la complexité du squelette carboné et de leur degré d'oxydation. La première classe, qui comprend les acides phénoliques simples, est divisée en deux groupes : les acides hydroxybenzoïques comme l'acide gallique et les acides hydroxycinnamiques tels que les acide caféique, férulique et coumarique ainsi que leurs esters phénoliques comme les acides chlorogénique ou rosmarinique (**figure 9**).

**Acides hydroxycinnamiques**

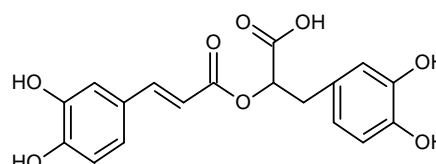
$R_1=R_2=R_3=H$	Ac. cinnamique
$R_1=R_3=H, R_2=OH$	Ac. p-coumarique
$R_1=R_2=OH, R_3=H$	Ac. caféique
$R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$	Ac. férulique
$R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$	Ac. sinapique

**Acides hydroxycinnamiques**

$R_1=R_2=R_3=R_4=H$	Ac. benzoïque
$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$	Ac. protocatéchique
$R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$	Ac. gallique
$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$	Ac. salicylique
$R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$	Ac. gentisique

**Hydroxycinnamates (acide chlorogénique)**

$R_1=R_2=OH, R_3=OH$	Ac. 5-caféoylquinique
$R_1=R_3=H, R_2=OH$	Ac. p-coumaroylquinique
$R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$	Ac. féruloylquinique
$R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$	Ac. sinapoylquinique

**Autres acides phénoliques**

Ac. rosmarinique

**Figure 9 : Structures chimiques des acides phénoliques simples et de ses principaux dérivés.**

La seconde classe regroupe la famille des flavonoïdes, dont la structure de base est en C6-C3-C6. Elle renferme plusieurs milliers de molécules réparties en plus de dix classes, notamment celles des flavones (apigénine, lutéoline), des flavonols (quercétine, myricétine), des flavanones (naringénine, hespéritine), des flavanols (catéchine, gallocatéchine), des isoflavones (daidzéine) et des anthocyanines (cynidine-3-glucoside) (**figure 10**). Les différentes classes de flavonoïdes se distinguent par le nombre et la position des hydroxyles aromatiques, par le degré de méthylation et par le nombre, le site et la nature des glycosylations. Ainsi, dans les végétaux, les flavonoïdes sont le plus souvent présents sous forme glycosylée. Cette structure est supposée les protéger de leur propre dégradation et réduire leur toxicité vis-à-vis de la plante (Jones and Vogt,

2001). Les troisième et quatrième classes des polyphénols correspondent respectivement aux stilbènes et aux lignanes.

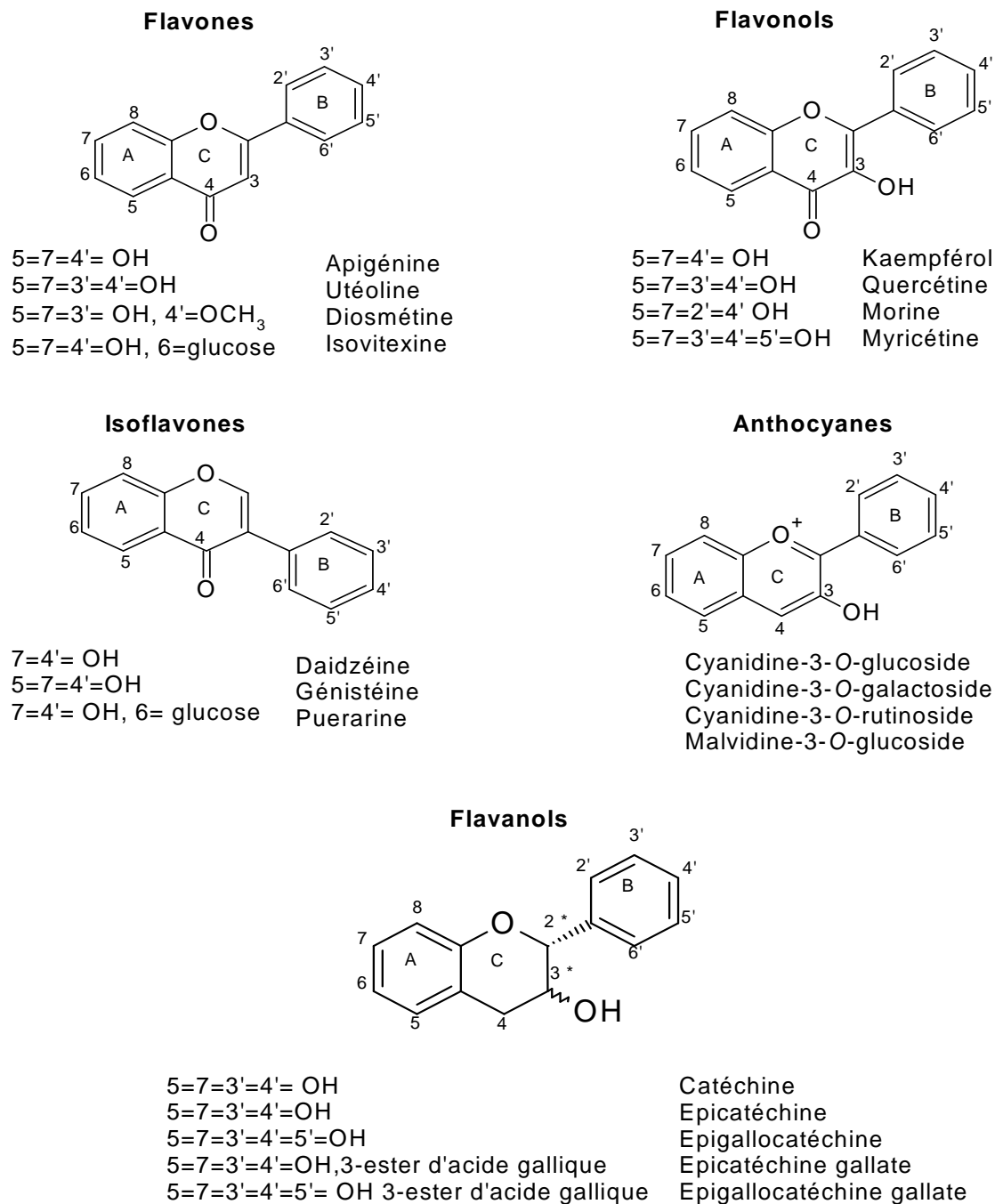


Figure 10 : Principales classes de flavonoïdes.

Le nombre de publications concernant les polyphénols n'a pas cessé d'augmenter de manière exponentielle depuis la fin des années 80 (Quideau *et al.*, 2011). Ces molécules suscitent, en effet, un grand intérêt de la part des industries alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques à divers titres. Elles possèdent une activité antibactérienne, et sont dotées de propriétés biologiques particulièrement intéressantes. Enfin, le « french paradox » a attiré l'attention de bien des scientifiques. Il s'agit là d'une observation paradoxale qui met en parallèle l'existence en France de facteurs nutritionnels et sociologiques néfastes tels qu'une alimentation riche en lipides et une forte consommation de tabac, avec un risque de développer des maladies cardiovasculaires plus faible que dans les pays du nord de l'Europe (Allemagne). Une des explications possible résiderait dans une consommation plus élevée de vin rouge, riche en polyphénols qui préviendrait des maladies cardiovasculaires (Renaud and Delorgeril, 1992). L'étude des effets protecteurs des flavonoïdes a conforté cette hypothèse. Ces polyphénols ont un effet vasodilatateur, anti-inflammatoire et antiviral. De plus, ils inhibent l'activité des phospholipases A2 et des lipoxygénases associées à la production de radicaux libres (Middleton *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Activité biologique des polyphénols

L'activité antioxydante des polyphénols réside dans les groupements hydroxyles greffés sur le noyau benzénique. La capacité du phénol à céder un atome d'hydrogène peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison O-H (Bond Dissociation Energy, BDE). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'atome H (Leopoldini *et al.*, 2011). La perte d'un hydrogène et d'un électron forme l'ion phénoxy, stabilisé par mésomérie (**figure 11**). Cependant, la rupture homolytique O-H est modulée par les substituants des noyaux phénoliques capables d'étendre la délocalisation électronique. Les substituants à effet mésomère donneur d'électrons (+M) tels que les fonctions méthoxy (O-CH<sub>3</sub>) et hydroxyles (O-H) en position *ortho* ou *para* de l'hydroxyle facilitent le transfert de l'atome d'hydrogène phénolique vers le radical lipopéroxy (LOO<sup>•</sup>).



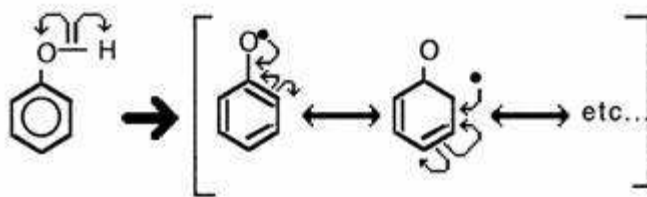
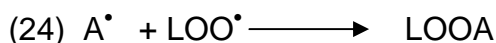
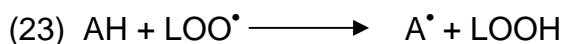
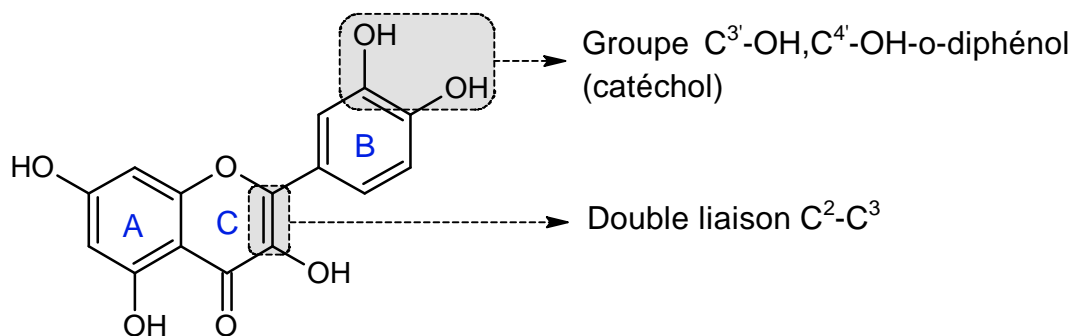


Figure 11 : Stabilisation du radical phénolique

De manière générale, les composés phénoliques (AH) cèdent un hydrogène aux peroxydes des lipides ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Les hydroperoxydes (LOOH) formés stoppent la réaction de propagation de la peroxydation lipidique (réaction 23). Le radical phénolique ( $\text{A}^\bullet$ ) peut donc réagir à nouveau avec les peroxydes lipidiques (réaction 24). Cependant, l'efficacité antioxydante n'est pas équivalente pour tous les polyphénols. En effet, la rupture de la liaison homolytique O-H est influencée par la position des groupements hydroxyles. Elle est d'autant plus facilitée que le niveau de conjugaison du système est élevé.

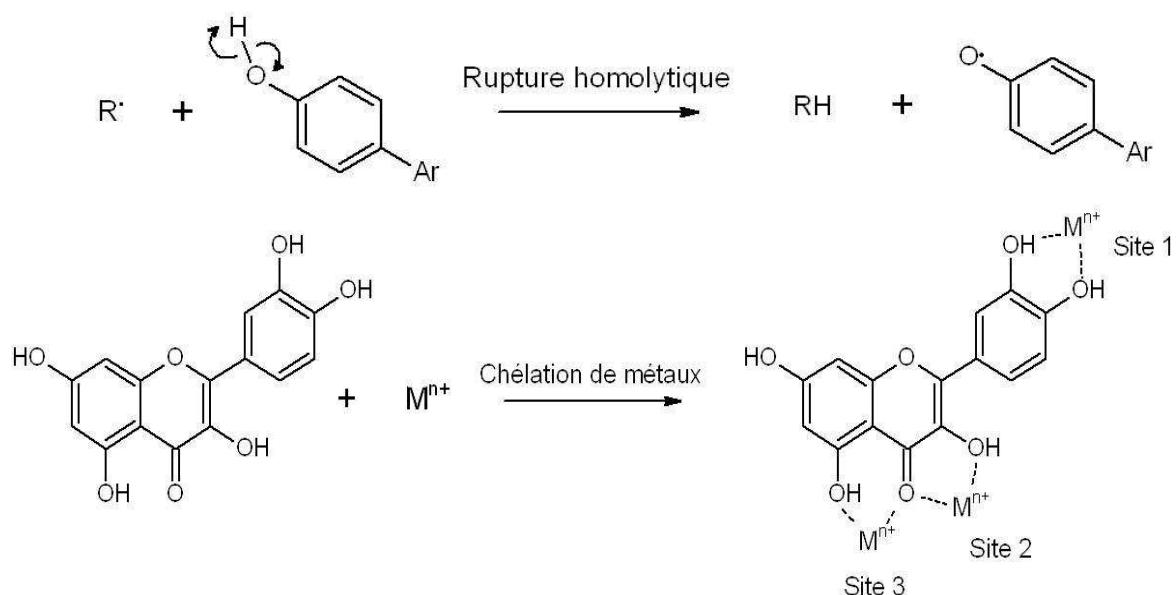


La capacité des polyphénols à piéger les radicaux libres est généralement déterminée *in vitro* à l'aide de différentes méthodes telles que par exemple, le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et le test DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl 2,2-diphenylpicrylhydrazyl) en équivalent trolox (TEAC, Trolox equivalent Antioxidant Capacity). La relation structure-activité antioxydante dépend de trois critères (**figure 12**) : i) la présence du groupe 3',4'-dihydroxy (structure catéchol) sur le cycle B qui participe à la délocalisation électronique et à la stabilité du radical phénoxy ; ii) la conjugaison de la double liaison 2,3 de l'hétérocycle C avec la fonction 4-oxo de même cycle qui intervient également dans la délocalisation électronique du cycle B ; iii) les hydroxyles en position 3 et 5 et la fonction 4-oxo sur les cycles A et C qui, en plus de leur capacité antioxydante, chélatent les métaux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) (Rice-Evans *et al.*, 1996) (Perron and Brumaghim, 2009).



**Figure 12 : Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes**

La structure catéchol (deux hydroxyles phénoliques vicinaux) est plus efficace que la structure pyragol (trois hydroxyles phénoliques vicinaux). En effet, parallèlement à ses capacités à céder un hydrogène et un électron (rupture homolytique O-H), la structure catéchol est mise en jeu dans la chélation des métaux comme Fe<sup>2+</sup> (**figure 13**) (Perron and Brumaghim, 2009). Or, l'un des facteurs liés au stress oxydant est la présence de métaux impliqués dans les réactions de Fenton. En particulier, une concentration élevée en Fe<sup>2+</sup> a été observée dans les maladies neurodégénératives telles que Parkinson ou Alzheimer (Day *et al.*, 2003 ; Bartzokis *et al.*, 2000). Ainsi, les polyphénols aptes à chélater les métaux peuvent limiter les réactions de Fenton qui entraînent la production d'anions superoxydes et de Fe<sup>3+</sup> (Perron and Brumaghim, 2009).



**Figure 13 : Mécanisme de l'activité antioxydante. D'après Leopoldini *et al.*, 2011**

L'activité antioxydante de nombreux polyphénols a été décrite dans la revue de Han *et al.* (2007). L'acide dihydrocaféique est capable de piéger les radicaux libres dans des cellules épithéliales humaines (Huang *et al.*, 2004). Le curcumin et la quercétine stimulent à la fois *in vitro* et *in vivo* l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion réductase (Shen *et al.*, 2007 ; Molina *et al.*, 2003). L'hydroxytyrosol semble également améliorer l'activité de la CAT et de la SOD chez des rats dont l'alimentation est riche en cholestérol (Fki *et al.*, 2007).

L'activité biologique des acides phénoliques s'explique principalement par leur capacité à piéger les radicaux libres et à chélater les métaux ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Cependant, en plus de leur activité antioxydante, les acides phénoliques peuvent modifier l'activité de protéines clés impliquées dans les voies de signalisation contrôlant l'apoptose ou l'inflammation (Soobrattee *et al.*, 2005). Par exemple, l'epigallocatechine gallate (EGCG) active la voie des MAPkinases (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase), cascade de phosphorylations qui contrôle la prolifération, la différenciation cellulaire et l'angiogenèse (Han *et al.*, 2007).

Parmi les polyphénols, nous avons choisi l'acide rosmarinique comme molécule de référence dans ces travaux de thèse. Il s'agit d'un acide hydroxycinnamique présent dans de nombreuses plantes comme la sauge, le romarin ou le thym. Il a été isolé pour la première fois par Scarpati et Oriente 1958. Sa biosynthèse a été déterminée dans la plante de *Coleus blumei*. En effet, lors d'une réponse de la plante contre des pathogènes, une forte concentration de cet acide a été détectée (Petersen and Simmonds, 2003).

Sa forte activité antioxydante provient de ses deux groupements catéchols. Il possède la meilleure de tous les acides hydroxycinnamiques (Soobrattee *et al.*, 2005).

L'acide rosmarinique possède également plusieurs propriétés biologiques. Son activité anti-inflammatoire est bien établie. En effet, Osakabe *et al.* (2004) ont mis en évidence que des traitements par des extraits de *Perilla frutescens* riches en cet acide, agissaient contre l'inflammation de la peau. Il peut aussi avoir des effets préventifs dans des pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (Karthik *et al.*, 2011) le diabète (Tavafi *et al.*, 2011). De plus, Gao *et al.* (2005) ont démontré

que ce polyphénol réduisait l'apoptose des astrocytes en inhibant l'activité de la capsase-3 et pouvait donc avoir un effet neuroprotecteur. D'autres études ont reporté que l'acide rosmarinique était également capable de limiter l'apoptose des cellules du muscle cardiaque (Kim *et al.*, 2005) et celle des neurones dopaminergiques (Lee *et al.*, 2008). Ces résultats pourraient être corrélés à ceux d'Hamaguchi *et al.* (2009) qui ont révélé son rôle préventif dans le traitement contre la maladie d'Alzheimer. Cependant, des effets pro-oxydants du polyphénol ont été démontrés récemment. En effet, la formation de composés instables qui correspondent aux dérivés quinones de l'acide rosmarinique peuvent induire une cytotoxicité (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012).

### 2.2.3 Biodisponibilité des polyphénols

Afin d'étudier le métabolisme et l'absorption de l'acide rosmarinique, Baba *et al.* (2004) ont administré, par voie orale, 50 mg/kg de ce polyphénol chez le rat. L'acide rosmarinique et ses métabolites ont été mesurés dans les urines et le plasma par LC-MS. Selon ces auteurs, l'acide rosmarinique traverse la barrière intestinale sous forme conjuguée, ou après hydrolyse sous forme d'acide caféique ou coumarique. L'absorption intestinale de l'acide chlorogénique semble s'effectuer de manière similaire (Azuma *et al.*, 2000).

D'autres études *in vivo* ont montré que l'absorption intestinale des flavonoïdes a rarement lieu sous leur forme native, mais met en jeu des processus de glucuronidation, de méthylation ou sulfatation et/ou d'hydrolyse. A titre d'exemple, les flavonoïdes glycosylés traversent la paroi intestinale après l'hydrolyse du glucide (aglycone) par la  $\beta$ -glucosidase. Le transport de l'aglycone peut s'effectuer via le transporteur glucose-sodium dépendant ou par diffusion passive comme c'est le cas avec la quercétine (Day *et al.*, 2003). La seconde voie d'absorption des polyphénols est la méthylation d'un ou plusieurs hydroxyles. Cette réaction est catalysée par la catéchol-O-méthyl transférase, impliquée également dans le métabolisme des catéchines, de l'épicatéchine et des flavonoïdes du thé vert (Piskula and Terao, 1998 ; Okushio *et al.*, 1999).

L'utilisation des polyphénols dans la prévention des dommages oxydatifs associés à certaines pathologies semble être une stratégie prometteuse, bien que

les effets biologiques s'appuient majoritairement sur des tests *in vitro* (lignées cellulaires). Ces données posaient donc avec acuité la question de la biodisponibilité des polyphénols dans l'organisme, après leur ingestion. Des études *in vivo* chez le rat ont permis de déterminer la biodisponibilité des polyphénols retrouvés dans le thé, le vin rouge ou le jus de pommes, en mesurant leurs concentrations dans le plasma et les urines. Il apparaît ainsi que 75% à 99% des polyphénols apportés par l'alimentation ne sont pas absorbés sous leur forme native par l'organisme (Scalbert and Williamson, 2000). Lors de l'absorption, les glycosylations ou les méthylations précédemment décrites sur les fonctions hydroxyles ou carboxyliques sont susceptibles d'engendrer une diminution de leur activité antioxydante. Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'une nouvelle stratégie destinée à améliorer l'absorption en véhiculant les antioxydants via un composé du type cationique lipophile, peptidique ou lipidique. Ces antioxydants « fonctionnalisés » seront décrits dans le paragraphe suivant.

## Partie III : Fonctionnalisation des antioxydants

Pour qu'une drogue soit active, encore faut-il qu'elle puisse traverser les membranes biologiques (les cellules épithéliales de l'intestin, la peau ou encore les cellules des vaisseaux sanguins) sans perdre la majeure partie de ses propriétés biologiques essentielles. La perméabilité membranaire, l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion sont des paramètres importants qui définissent l'efficacité d'une drogue. En particulier, la connaissance du rôle et de la structure de la membrane plasmique est primordiale si l'on souhaite adresser des molécules actives dans les tissus et au cœur de la cellule.

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont ancrées des protéines transmembranaires. Le transport des molécules à travers la membrane plasmique s'effectue soit dans le sens du gradient de concentration, ce qui ne nécessite pas d'apport d'énergie, soit dans le sens inverse, avec consommation d'énergie sous forme d'ATP. Il existe donc deux types de transport, l'un passif et l'autre actif couplé à une source d'énergie. Le transport actif permet l'absorption des molécules dont la vitesse de diffusion à travers la membrane plasmique est faible. C'est le cas des molécules polaires chargées (les acides aminés), des molécules non chargées (glucose, saccharose) et des ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ...). Le transport passif utilise la perméabilité de la bicouche phospholipidique aux petites molécules telles que l'oxygène, l'azote ou le dioxyde de carbone. D'autres molécules de taille plus importantes, de par leur caractère hydrophobe, peuvent se dissoudre dans la membrane, comme cela a été rapporté pour les hormones stéroïdes et les dérivés du cholestérol (Liu *et al.*, 2011). *A contrario*, les hormones thyroïdiennes sont véhiculées par une protéine, la transthyrétine, à travers la membrane (Palha, 2002). La lipophilie de la molécule est donc un élément indispensable à prendre en compte pour évaluer sa capacité à traverser les membranes biologiques. Elle est caractérisée par le logP qui est défini comme le logarithme du coefficient de partition octanol/eau de la molécule entre ces deux solvants. Cependant, le problème de la biodisponibilité est complexe puisqu'une molécule doit être suffisamment hydrophile pour être soluble dans les milieux aqueux et suffisamment hydrophobe pour traverser les membranes cellulaires.

Sur ces bases, une des règles généralement utilisées en pharmacologie est la règle de Lipinski *et al.* (1997) qui prédit l'efficacité d'une molécule en se basant sur cinq paramètres : un nombre de groupements donneurs d'hydrogène supérieur à 5, un nombre d'accepteurs d'hydrogène supérieur à 10, une masse moléculaire supérieure à 500 et un logP inférieur ou égal à 5. Cette approche permet de prédire la solubilité, la perméabilité et l'efficacité d'une drogue. Cependant, cette règle ne s'applique pas à toutes les molécules actives, car elle ne tient pas compte, par exemple, des interactions moléculaires ou de la toxicité des composés (Walters, 2012).

Pour améliorer le transport des drogues dans l'organisme, plusieurs méthodes ont été mises au point. L'utilisation de véhicules tels que les polymères, les liposomes ou les nanoparticules (Blanco *et al.*, 2011) ou les micelles (Torchilin, 2006), qui fusionnent avec la membrane plasmique pour délivrer le principe actif, a été l'une des premières approches. L'un des verrous de cette méthode réside dans la non spécificité de la diffusion cellulaire du composé actif, ce qui nécessite l'utilisation de fortes concentrations pouvant induire une cytotoxicité. De manière intéressante, la modification chimique de molécules actives avec un vecteur cationique lipophile (Triphénylphosphonium, TPP<sup>+</sup>) ou peptidique a permis de cibler des organites cellulaires spécifiques tels que la mitochondrie et ainsi d'utiliser des concentrations plus faibles de la molécule d'intérêt. Ces nouveaux composés appelés « antioxydants mitochondriotropiques » seront décrits dans la partie suivante. Une seconde approche qui consiste à moduler l'hydrophobie d'une molécule (lipophilisation) afin d'améliorer ses propriétés antioxydantes dans différents systèmes (émulsions, liposomes, cellules) sera ensuite présentée.

## **1 Les antioxydants mitochondriotropiques**

L'adressage spécifique de molécules antioxydantes dans la mitochondrie afin de prévenir les dommages oxydatifs dans la cellule constitue une nouvelle stratégie développée depuis une dizaine d'années. En effet, la mitochondrie est non seulement un producteur majeur d'EROs, mais aussi une cible de ces molécules qui sont susceptibles d'altérer gravement la fonctionnalité de cet organite.

La mitochondrie intervient dans différents mécanismes cellulaires, incluant la production d'ATP, la régulation de la concentration intracellulaire du calcium, le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et dans les voies de signalisation induisant l'apoptose (Gulbins *et al.*, 2003). Compte tenu de l'activité continue de la chaîne respiratoire, l'anion superoxyde et le radical hydroxyle formés vont produire directement des altérations de l'ADN mitochondrial et de la membrane interne. Une surproduction d'EROs mitochondriales engendre, en effet, l'oxydation des protéines, des lipides, du génome mitochondrial et contribue à la génération de diverses pathologies, incluant les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. La cytotoxicité des EROs est contrôlée par des enzymes comme la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase 2 et par des molécules antioxydantes telles que le glutathion, l'ubiquinone ou les vitamines E et C. Cependant, ces enzymes ne sont pas adressées à la mitochondrie, et l'efficacité des antioxydants exogènes est limitée compte tenu de leur difficulté à traverser les membranes plasmiques ou mitochondriales. En effet, la vitamine E et le coenzyme Q sont des composés très lipophiles, retenus dans les membranes plasmiques qui exercent une forte toxicité à haute concentration. Afin de contourner ce problème, l'une des stratégies utilisées a consisté à greffer sur l'antioxydant une molécule permettant un adressage spécifique à la mitochondrie.

Les stratégies pour cibler la mitochondrie sont basées sur la connaissance des mécanismes de transfert à travers les membranes externe et interne de l'organite. La membrane externe permet le libre passage des acides gras, du pyruvate, des acides aminés et des nucléotides grâce à des protéines transmembranaires qui forment de véritables pores : les protéines VDAC (Voltage Dependent Anion Channel). D'autres complexes protéiques, la TOM (translocase of outer membrane) et la TIM (translocase of inner membrane), permettent, quant à elles, de transporter toutes les enzymes nécessaires à la chaîne respiratoire, au cycle de Krebs et à la bêta-oxydation (Kaldi and Neupert, 1998). La membrane interne est imperméable aux métabolites en raison de la quantité élevée de cardiolipines (20% des lipides totaux) qui stabilise la bicouche lipidique et diminue la fluidité membranaire (Yamauchi *et al.*, 1981). Les échanges entre l'espace intramembranaire et la matrice mitochondriale sont très sélectifs et sont réalisés par des transporteurs ou échangeurs (Protéines TIM). La taille des pores des protéines TIM est de 1,3 nm



(Schwartz and Matouschek, 1999) alors que celle des pores VDAC est comprise entre 3 et 6 nm (Pfanner and Truscott, 2002). L'énergie utilisée par ces protéines de transport est généralement la force protomotrice. En effet, l'activité de la chaîne respiratoire (phosphorylation oxydative) et la synthèse d'ATP créent un gradient de protons via leur accumulation dans l'espace intramembranaire. Par conséquent, la matrice mitochondriale est chargée négativement. Ainsi, le ciblage dans la matrice est limité dans la mesure où les molécules à transférer doivent être de petites tailles et chargées positivement (Horobin *et al.*, 2007). Deux stratégies ont été proposées pour cibler la mitochondrie : la conjugaison d'antioxydants au TPP<sup>+</sup> (Smith *et al.*, 2003; Murphy and Smith, 2007) et l'utilisation de peptides SS (Szeto et Schiller) ou MPP (Mitochondria Penetrating Peptides) (Horton *et al.*, 2008).

## 1.1 Conjugaison d'antioxydants au Triphenylphosphonium

Smith *et al.* (2003) ont développé l'utilisation d'un cation lipophile : le TPP<sup>+</sup> composé similaire à la rhodamine 123. Il a la capacité de traverser la membrane interne mitochondriale en utilisant le potentiel de membrane comme force électrostatique (**figure 14**).

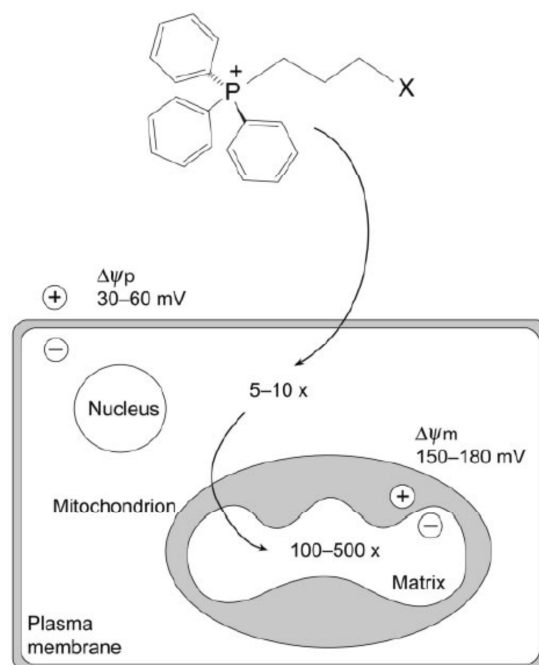
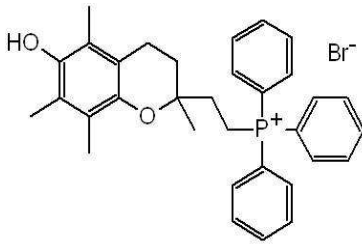
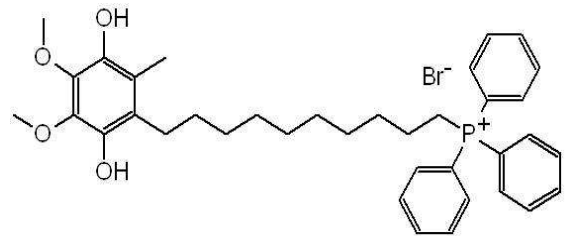


Figure 14 : Transport du TPP<sup>+</sup> vers la matrice mitochondriale, d'après Smith *et al.*, 2003

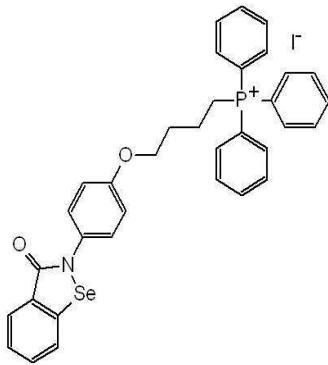
Une large gamme d'antioxydants a été greffée sur le TPP<sup>+</sup> comme la vitamine E, l'ebbselen (mitoperoxidase) et l'ubiquinone (coenzyme Q<sub>10</sub>) (**figure 15**).



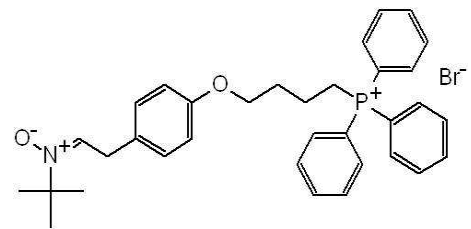
[2-(3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)ethyl]triphenylphosphonium bromide (MitoVit E)



10-(6' Ubiquinolyl) decyltriphenylphosphonium Bromide (Mitoquinol ou MitoQ)



2-[4-(4-Triphenylphosphoniobutoxy)phenyl]-1,2-benzoselenazepin-3-one iodide



[4-[4-[[1,1-Dimethylethyl)oxidoimino]methyl]phenoxy]butyl]triphenylphosphonium bromide (MitoPNB)

**Figure 15: Estérification de la vitamine E (MitoVitE), du Coenzyme Q (MitoQ) et de l'ebbselen (Mitoperoxidase)**

Le coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) est utilisé dans les traitements de la maladie de Parkinson pour diminuer les dommages oxydatifs mitochondriaux (Shults *et al.*, 2004). Cependant, seule une partie de l'apport exogène de CoQ<sub>10</sub> est captée par la mitochondrie. Le greffage du TPP<sup>+</sup> sur le coenzyme Q<sub>10</sub> forme le mitoQ. Ce composé traverse rapidement les membranes et s'accumule sélectivement dans l'organite. La réduction de l'ubiquinone sous sa forme active, l'ubiquinol, permet de piéger les

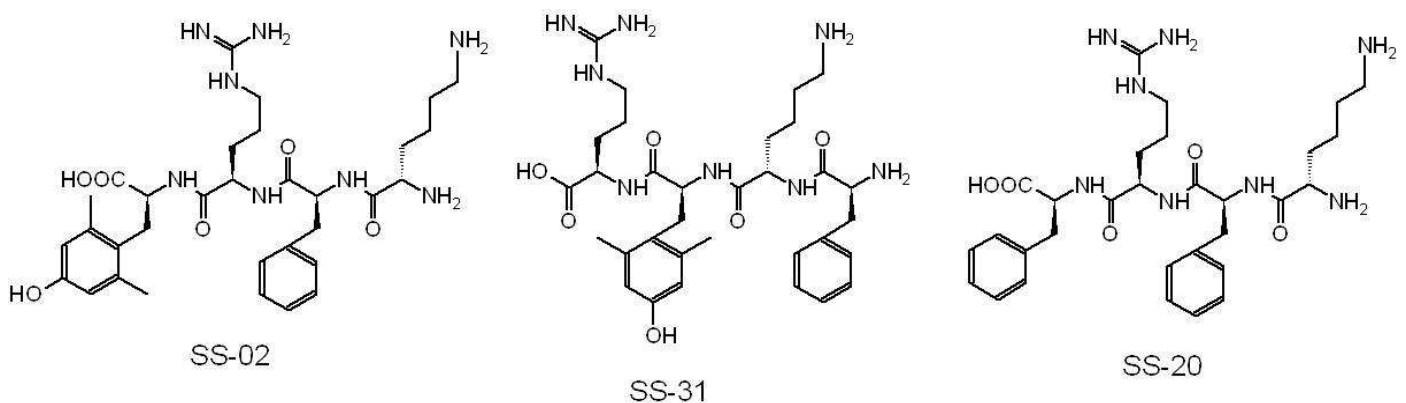
EROs et de minimiser les dommages oxydatifs. De plus, l'ubiquinone est recyclée par la chaîne respiratoire en ubiquinol.

La vitamine E est connue pour ses capacités à inhiber la peroxydation lipidique. Localisée dans la membrane plasmique, sa diffusion est limitée. Son association avec le  $\text{TPP}^+$  forme le mitoVitE qui s'accumule rapidement dans la mitochondrie. L'efficacité du mitoVitE dans la prévention des dommages oxydatifs et dans l'inhibition de l'apoptose a été étudiée sur des cellules endothéliales. Les travaux de Sheu *et al.* (2006) ont montré que cette molécule diminue la production du peroxyde d'hydrogène et limite la peroxydation lipidique. L'entrée du mitoVit E et du mitoQ dépend du potentiel de membrane mitochondrial, mais l'accumulation du  $\text{TPP}^+$  dans la matrice génère une dépolarisation et engendre une diminution de la synthèse d'ATP.

## 1.2 Les peptides SS et MPP

La seconde stratégie pour cibler la mitochondrie consiste à utiliser les térapeptides SS (Schiller Szeto) dont la séquence ne contient que des acides aminés aromatiques et basiques (Szeto, 2006). Trois peptides ont été synthétisés : le SS-02, SS-20 et SS-31 (**figure 16**). Les propriétés antioxydantes de ces peptides résident dans le groupement 2'-6'-diméthyltyrosine (Dmt).

Les peptides SS portent trois charges positives à pH physiologique. Les études sur culture cellulaire confirment que ces composés traversent rapidement la membrane plasmique et s'accumulent dans les mitochondries (Zhao *et al.*, 2004).



**Figure 16 : SS-02 Dmt-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>, SS-31 D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>, SS-20 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>**

Le traitement des cellules Caco-2 avec du FCCP, un découplant de la chaîne respiratoire, diminue de 20% l'entrée des SS-02 et SS-20. L'entrée des peptides SS ne dépend donc pas totalement du potentiel de membrane. Cependant, 85% des peptides SS-02 sont associés à la membrane interne. Malgré leur charge positive, les peptides SS ne s'accumulent donc pas dans la matrice et ne provoquent pas de dépolarisation mitochondriale. Il est intéressant d'observer que le peptide SS-20, dont le Dmt est remplacé par la phénylalanine, n'a pas d'activité antioxydante, confirmant ainsi l'importance de cette séquence (Zhao *et al.*, 2004).

Le ciblage de la mitochondrie avec les peptides SS permet de limiter les dommages oxydatifs. En effet, le traitement des cellules avec le tBHP (tert-butylhydroperoxide) provoque l'oxydation des bases pyrimidiques et augmente la production de radicaux libres. Dans ces conditions, un traitement par le peptide SS-31 réduit la concentration d'EROs et la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Nieminen *et al.*, 1997). De plus, cette classe de peptides protège les mitochondries des dégradations oxydatives associées aux maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

Plus récemment, un nouveau type de peptide a été synthétisé avec des acides aminés hydrophobes (phénylalanine et cyclohexylalanine) ou cationiques (lysine, arginine). Ces peptides MPPs (Mitochondria Penetrating Peptides) dépendent du potentiel de membrane. Ils permettent de délivrer dans la mitochondrie des petites molécules comme la biotine (Horton *et al.*, 2008).

## 2 Fonctionnalisation des antioxydants par lipophilisation

Parmi les antioxydants naturels, l'utilisation des composés phénoliques représente un intérêt majeur pour limiter l'oxydation lipidique dans les formulations de type émulsion huile dans eau et au sein des membranes cellulaires. En effet, les antioxydants peuvent prévenir ou stopper la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux libres ou en chélatant les métaux lourds comme  $\text{Fe}^{2+}$  (Shahidi and Zhong, 2007). Cependant, l'efficacité des antioxydants dépend du milieu dans lequel ils se trouvent selon qu'ils soient dans une huile ou dans des systèmes émulsionnés. Ceci est bien illustré par le paradoxe polaire de Porter *et al.* (1993) décrit en 1989, selon

lequel les antioxydants polaires seraient plus efficaces pour limiter l'oxydation des huiles seules alors que les composés apolaires seraient plus efficaces dans les émulsions huile dans eau. Cette notion de paradoxe polaire a été utilisée pendant deux décennies pour prédire les capacités antioxydantes dans un milieu hétérogène. Frankel *et al.* (1994) ont proposé une explication du paradoxe polaire en introduisant le concept de l'oxydation à l'interface. L'efficacité des antioxydants lipophiles pourrait être due à leur concentration à l'interface huile/eau où l'oxydation lipidique se produit. En revanche, dans une huile, les antioxydants hydrophiles seraient localisés à l'interface huile/air où a lieu l'oxydation. Ce comportement paradoxal est en accord avec le fait que l'acide ascorbique, les acides carnosiques ainsi que le trolox (un équivalent hydrophile de la vitamine E) sont de meilleurs antioxydants en milieu lipidique homogène que leurs homologues lipophiles ( $\alpha$ -tocophérol, ascorbyl palmitate et carnosol). Cette théorie a permis à de nombreux scientifiques de déterminer la structure optimale des molécules afin d'améliorer leur interaction avec l'interface et de limiter plus efficacement l'oxydation lipidique dans les émulsions ou les liposomes.

Il est généralement admis que le nombre et la position des groupements donneurs d'hydrogène (Ph-OH, OH, SH) (Soobrattee *et al.*, 2005) ont une grande importance. Les capacités d'une molécule antioxydante à céder un hydrogène et à être stable sous sa forme radicalaire ne sont pas les seuls paramètres qui affectent leurs propriétés antioxydantes. En effet, la diffusion et la localisation de l'antioxydant sont deux paramètres clés impliqués dans leur efficacité. Ils dépendent de l'hydrophobie de la molécule caractérisée par son logP ou son HLB (hydrophile lipophile balance). Dans des systèmes compartimentés, tels que les émulsions et les cellules, les composés hydrophobes sont généralement plus actifs. En effet, l'augmentation de l'hydrophobie augmente l'affinité avec la bicouche phospholipidique des membranes plasmiques ou leur localisation à l'interface huile/eau. L'une des stratégies exploitables pour moduler l'hydrophobie est de greffer des chaînes lipidiques par liaisons covalentes sur des structures chimiques réceptrices au sein de la molécule cible sans toutefois affecter les fonctions catéchols et/ou hydroxyles (Figueroa-Espinoza and Villeneuve, 2005). L'objectif est d'ajuster la balance hydrophile-hydrophobe des antioxydants pour améliorer leurs capacités antioxydantes. Ces réactions sont dites de lipophilisation.

La lipophilisation apparaît de plus en plus comme une étape cruciale dans la conception de la molécule. Après un bref rappel de cette réaction, l'évaluation des propriétés antioxydantes des esters sera décrite dans trois systèmes différents : dans une émulsion huile/eau, dans les liposomes et dans les cellules.

## 2.1 Stratégie de lipophilisation

La lipophilisation correspond à l'estérification d'une molécule hydrophile (vitamine C, sucres, acides aminés, composés phénoliques) avec une chaîne lipidique (alcool gras, acide gras, diacylglycérol, stérol). Ces réactions sont généralement réalisées par des procédés biocatalysés mettant en œuvre des lipases. Parmi les lipases usuelles, la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est une des enzymes les plus performantes qui est utilisée dans de nombreuses applications industrielles (Anderson *et al.*, 1998). Cette enzyme peut être supportée sur une résine acrylique macroporeuse, elle est commercialisée sous le nom de Novozyme 435 (Novozyme, Danemark). Cette propriété lui confère une grande stabilité thermique et un maintien de son activité dans différents solvants organiques (Trodler and Pleiss, 2008).

Pour garantir des cinétiques et des rendements satisfaisants, deux principaux paramètres sont à prendre en compte lors d'une catalyse enzymatique : le solvant et l'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ) (Villeneuve, 2007).

Pour favoriser l'interaction entre les deux composés, l'ajout d'un solvant est parfois nécessaire. Son choix doit tenir compte non seulement de son aptitude à solubiliser les substrats mais également de sa capacité à ne pas dénaturer l'enzyme mise en œuvre. De nombreuses études ont été menées pour synthétiser des dérivés lipophilisés dont l'une des contraintes est la solubilisation des deux substrats : l'un lipophile et l'autre hydrophile. Le cyclohexane ou l'heptane, par exemple, ont permis d'estérifier l'acide cinnamique avec le butanol par CALB immobilisée avec des taux de conversion supérieurs à 85%. Par contre, des solvants polaires tels que le diéthyl éther, le *tert*-butylméthyl éther et le butanol n'ont pas favorisé la réaction (2% de rendement en cinq jours) (Buisman *et al.*, 1998). Dans le cas des sucro-esters, la lipophilisation a été optimale avec l'acétonitrile, car la solubilité du glucide est très faible dans les solvants apolaires (Adachi and Kobayashi, 2005).

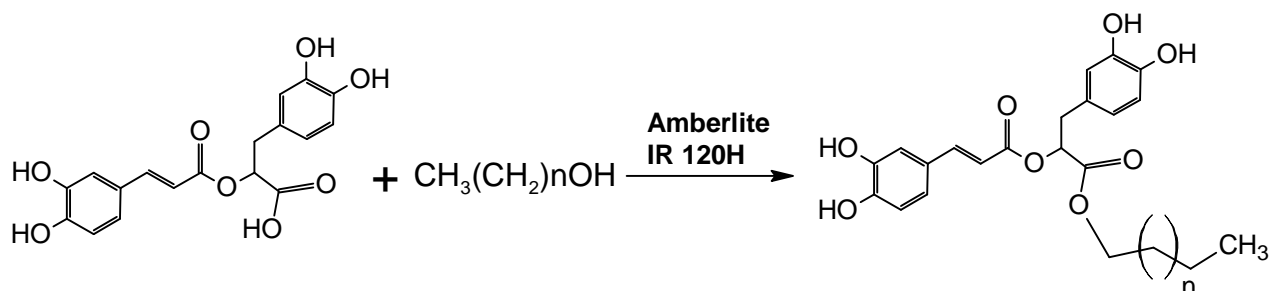
Pour remédier à ce problème de solubilité, une autre stratégie a été développée avec les liquides ioniques (Katsoura *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2012). En effet, ils ont l'avantage de solubiliser de nombreux composés, d'être non volatiles, thermiquement stables et sont considérés non toxiques (Jastorff *et al.*, 2003).

Le second paramètre clé à contrôler en synthèse enzymatique est l'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ). Cette dernière détermine la quantité d'eau liée à l'enzyme qui lui est nécessaire pour maintenir sa configuration optimale. Les  $a_w$  optimales pour obtenir la meilleure activité sont généralement comprises entre 0,25 et 0,45, soit des teneurs en eau comprises entre 0,5 et 1% (Figuerola-Espinoza and Villeneuve, 2005). Lorsque le donneur d'acyle est un acide gras, l'estérification génère la formation d'eau. Les réactions enzymatiques étant réversibles, un excès d'eau peut favoriser les réactions d'hydrolyse. Il est donc avantageux d'opérer dans des conditions réactionnelles permettant de déplacer l'équilibre vers la synthèse. Ainsi, l'eau formée lors de la synthèse peut être éliminée en ajoutant un tamis moléculaire ou en travaillant sous pression réduite. Une autre alternative est l'utilisation d'esters méthyliques ou éthyliques. En effet, l'élimination des alcools (méthanol, éthanol), produits lors de la synthèse, est thermodynamiquement plus aisée que celle de l'eau.

Aujourd'hui, de nombreux phénolipides ont été synthétisés (Figuerola-Espinoza and Villeneuve, 2005). Nous citerons dans ce manuscrit que certains exemples de phénolipides en fonction du vecteur lipidique greffé pour lesquels les catalyses enzymatiques ont toutes été réalisées par la Novozyme 435.

L'estérification d'une seule chaîne alkyle sur les polyphénols a été entreprise par plusieurs équipes. Guyot *et al.* (1997) sont les premiers à avoir estérifié du butanol sur des acides phénoliques de café vert. Un rendement de 97% a été obtenu lors de l'estérification de l'acide cinnamique avec l'alcool alors qu'aucune synthèse d'ester n'a été observée avec l'acide caféique. Puis, l'ajout d'un solvant (le 2-méthylbutanol) a permis de greffer sur l'acide chlorogénique des alcools gras de différentes longueurs de chaînes (8, 12 et 16 atomes de carbone) avec des rendements compris entre 40 et 75% (Guyot *et al.*, 2000). Buisman *et al.* (1998) ont également estérifié des dérivés benzoïques (acide gallique, vanillylique...) par différents alcools gras (C4, C6 et C12).

Par la suite, l'équipe de Villeneuve a synthétisé enzymatiquement une série de chlorogénates d'alkyle (C1 à C20) (López Giraldo *et al.*, 2007). Puis, par catalyse acide (Amberlite IR 120 H), ils ont additionné différents alcools gras (C1 à C20) sur l'acide rosmarinique (**figure 17**) (Lecomte *et al.*, 2010). Les rendements obtenus pour ces deux séries de phénolipides sont compris entre 81 et 98%.



**Figure 17 : Réaction de lipophilisation de l'acide rosmarinique avec différents alcools gras**

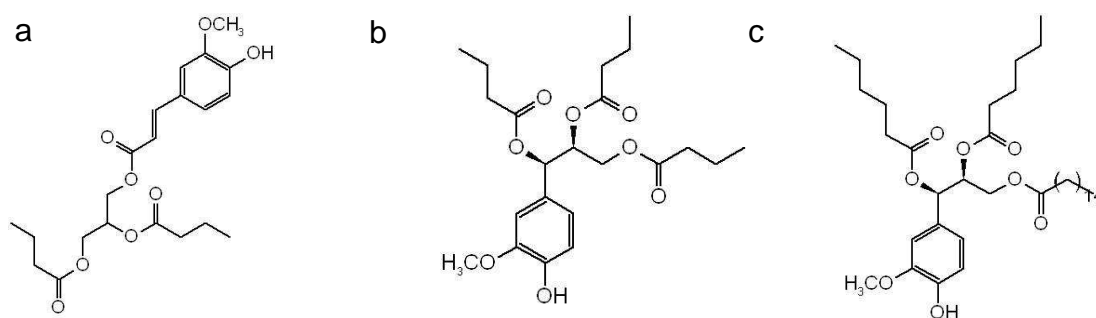
La transestérification de l'hydroxytyrosol et du tyrosol a été effectuée avec différents esters méthyliques de longueurs de chaînes alkyles. Les rendements de ces réactions de lipophilisation dépendent de l'hydrophobie des esters. Ils sont de 60% pour les esters méthyliques les plus hydrophobes et de 92% pour les plus hydrophiles (Mateos *et al.*, 2008). D'après les auteurs, les réactions en milieu fondu (sans solvant) ne favorisent pas la réaction entre l'acide et les esters méthyliques les plus hydrophobes.

D'autres composés comme la rutine et l'isoquercétine ont été estérifiés avec différents alcools gras (C4 à C18) dans le 2-méthylbutan-2-ol. Les rendements obtenus dépendent à nouveau de la longueur de la chaîne alkyle. En effet, l'estérification d'une courte chaîne alkyle (4 atomes de carbone) est supérieure à 50% alors que celle d'une longueur de 18 atomes de carbone est inférieure à 30% (Viskupicova *et al.*, 2010 ; Salem *et al.*, 2010).

D'autres équipes ont estérifié des composés phénoliques sur d'autres groupements lipidiques de type glycéridique. En 2010, Reddy *et al.* (2010) ont



synthétisé une série de férulates de diacylglycérol et ont obtenu des rendements compris entre 38 et 50%. Cette réaction s'est avérée, par contre, plus complexe que celles énumérées auparavant. En effet, cette synthèse s'est effectuée en plusieurs étapes. L'acide férulique a été greffé sur le glycérol via la réaction de Mitsunobu, puis les chaînes alkyles de longueurs variables (C6, C8, C12 et C18) ont été additionnées par catalyse enzymatique (Novozyme 435). Sabally *et al.* (2006) ont pu également estérifier un acide férulique sur un triacylglycérol pour obtenir le 1-féruloyl-dibutyroyl-glycérol (**figure 18, a**). Kanjilal *et al.* ont aussi synthétisé des dérivés lipophilisés à partir de cet acide : le 2,3-bis-butyryloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl butyrate (**figure 18, b**) et le 2,3-bis-hexanoyloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl hexadécanoate (**figure 18, c**) (Kanjilal *et al.*, 2008).

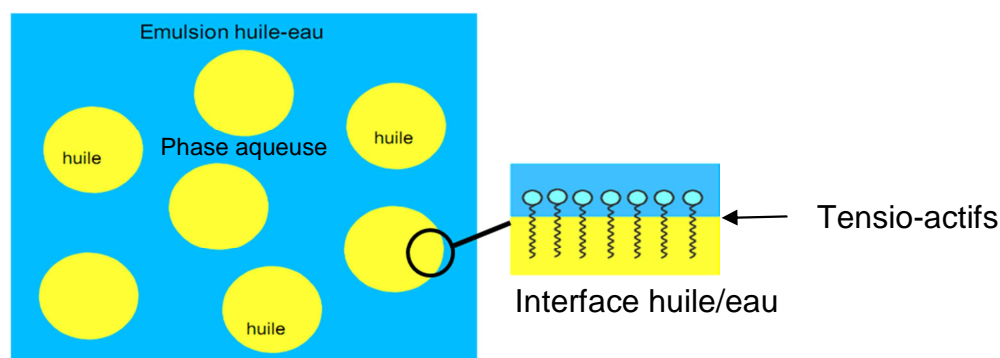


**Figure 18 : Dérivés d'acide férulique : a) 1-féruloyl-dibutyroyl-glycérol, b) 2,3-bis-butyryloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl butyrate, c) 2,3-bis-hexanoyloxy-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-propyl hexadécanoate**

Pour finir, l'estérification en deux étapes du dihydrocholestérol sur l'acide férulique a été étudiée par Chigorimbo-Murefu *et al.* (2009). Tout d'abord, l'acide férulique a été transestérifié avec l'acétate de vinyle en présence d'acétate de mercure. Puis, le férulate de vinyle produit a été greffé sur le dihydrocholestérol en présence de Novozyme 435.

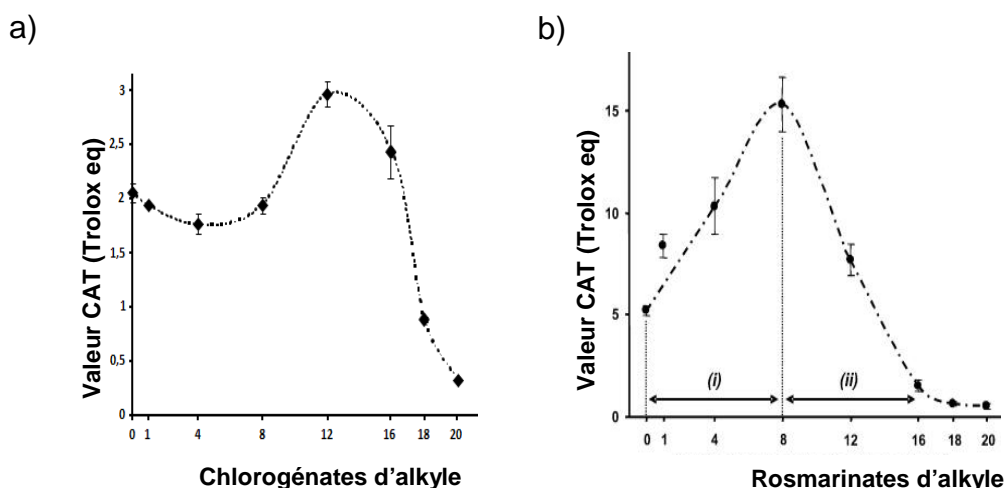
## 2.2 Activité antioxydante des phénolipides en émulsions

Les formulations alimentaires ou cosmétiques sont généralement des émulsions huile dans eau. Cette émulsion est composée de trois parties (**figure 19**) : i) les gouttelettes lipidiques, ii) une phase continue aqueuse, iii) une zone interfaciale huile/ eau.



**Figure 19 : Emulsion huile dans eau. La phase lipidique est représentée en jaune et la phase aqueuse en bleu**

En raison de l'existence de cette région interfaciale, l'efficacité des antioxydants dépend de leur structure chimique et de leur capacité à se localiser à cette interface. En 2009, Laguerre *et al.* ont mis au point la méthode CAT (Conjugated Autoxidation Triene assay) pour évaluer l'activité antioxydante des composés phénolipides dans une microémulsion huile de tung/tampon phosphate (pH=7,2) stabilisée par du Brij 35 (tensio-actif). Cette méthode est basée sur le suivi de l'oxydation de l'huile de tung initiée par les radicaux libres provenant de la décomposition thermique de l'AAPH (2,2'-Azo(2-AmidinoPropane diHydrochloride) qui est un azo-initiateur de type R-N=N-R) (Laguerre *et al.*, 2008). L'activité antioxydante des chlorogénates d'alkyle et des rosmarinales d'alkyle a été déterminée par cette technique. Laguerre *et al.* (2008) ont ainsi montré que les capacités antioxydantes des phénolipides augmentent jusqu'à une longueur de chaîne critique, au-delà de laquelle elles chutent. Pour les esters d'acide chlorogénique, la limite est de 12 atomes de carbone (**figure 20, a**), et pour ceux de l'acide rosmarinique, elle est de 8 atomes de carbone (**figure 20, b**).

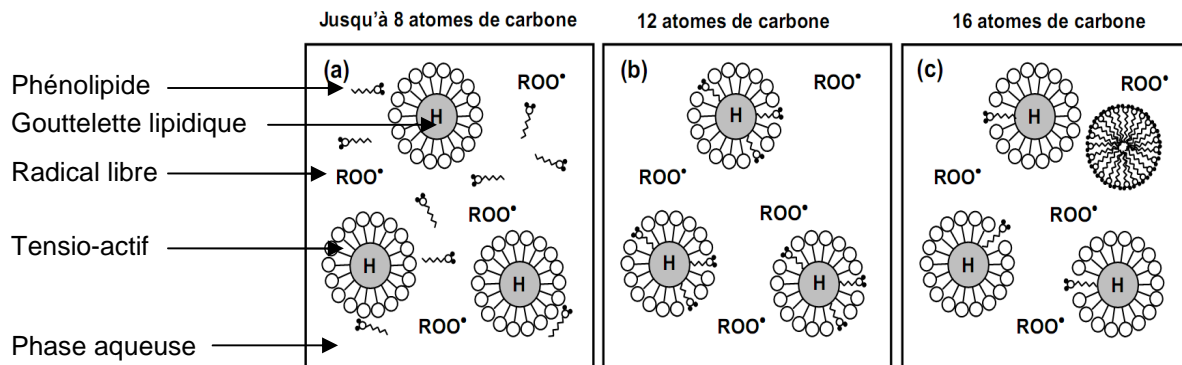


**Figure 20 : Influence de la longueur de la chaîne alkyle des chlorogénates : (a) et des rosmarinates (b) sur leur capacité à limiter l'oxydation de l'huile de tung dans une microémulsion huile dans eau. D'après Laguerre *et al.*, 2009**

Sur la base de ces observations, la relation non linéaire entre l'hydrophobie d'une molécule et ses capacités antioxydantes a été décrite comme un effet non linéaire, nommée également effet «cut-off». Plusieurs études réalisées avec différents composés phénoliques confirment cet effet non linéaire dans des systèmes émulsionnés. Medina *et al.* (2009) ont révélé cet effet «cut-off» en émulsion huile de poisson/eau dans laquelle l'activité antioxydante optimale est obtenue avec les hydroxytyrosols d'alkyle à huit atomes de carbone. De même, la lipophilisation en dihydrocaféate d'octyle de l'acide dihydrocaféique améliore ses capacités antioxydantes en émulsion huile dans eau (Sorensen *et al.*, 2012).

Le comportement non linéaire en émulsion semble s'expliquer en partie par la localisation de l'antioxydant à l'interface qui dépend de sa polarité et de sa mobilité. Laguerre *et al.* (2009) ont ainsi proposé qu'en fonction de la longueur de la chaîne alkyle des phénolipides, les composés les plus polaires seraient solubilisés dans la phase aqueuse (**figure 21, a**). L'effet antioxydant de l'acide chlorogénique et de ses esters méthyle, butyle et octyle ne serait donc pas optimal en raison de leur incapacité à piéger les radicaux libres à proximité du substrat oxydable. *A contrario*, lorsque la chaîne aliphatique greffée sur l'acide chlorogénique est de 12 atomes de carbone, l'effet antioxydant est maximal, probablement en raison d'un ancrage à l'interface huile/eau (**figure 21, b**). La chute de l'activité antioxydante des composés les plus apolaires correspondrait à une localisation soit dans la phase aqueuse sous

forme d'agrégats ou de micelles, soit à une solubilisation dans la phase lipidique (**figure 21, c**).



**Figure 21 : Localisation des chlorogénates d'alkyle en fonction de la longueur de la chaîne alkyle : a) esters à chaînes courtes, b) esters à chaînes moyennes, c) esters à chaînes longues. D'après Laguerre *et al*, 2009**

Les antioxydants lipophilisés possèdent une partie hydrophile (composé phénolique) et une partie hydrophobe (chaîne lipidique). Ces molécules dites amphiphiles peuvent donc s'organiser sous forme de micelles dans la phase aqueuse, en fonction de la longueur de la chaîne alkyle et de leur concentration. La distribution des phénolipides dans la phase aqueuse peut donc être associée à la concentration micellaire critique (CMC) et aux capacités des antioxydants lipophilisés à diminuer la tension interfaciale. Lucas *et al.* (2010) ont montré que la CMC des esters alkyles de l'hydroxytyrosol et du tyrosol est proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle : plus elle augmente, plus la CMC diminue. Cependant, un effet non linéaire est observé en fonction de la tension de surface à la CMC ( $\gamma_{CMC}$ ) et de la longueur de la chaîne alkyle. En effet, l'octyle hydroxytyrosol qui possède les meilleures capacités antioxydantes, abaisse le plus efficacement la tension de surface. Par conséquent, la chute de l'activité antioxydante des composés les plus apolaires peut être corrélée à une diminution de leur capacité tensioactive. Autrement dit, les antioxydants lipophilisés avec une longueur de chaîne supérieure à huit atomes de carbone s'organisent préférentiellement sous forme micellaire et/ou fusionnent avec les gouttelettes lipidiques dans lesquelles l'ester est solubilisé. La corrélation entre la localisation à l'interface et l'activité antioxydante a également été

confirmée avec le chlorogénate de dodécyle qui diminue la tension interfaciale (Sasaki *et al.*, 2010).

La formulation d'émulsions nécessite l'utilisation d'agents tensio-actifs. La concentration et le type d'émulsifiant peuvent modifier le comportement de l'antioxydant dans le système émulsionné. Comme cela a été décrit pour l'acide férulique ou isoférulique, leur localisation à l'interface huile/eau et leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique sont influencées par le type de tensio-actif (cationique, anionique ou non ionique) utilisé (Oehlke *et al.*, 2010). En effet, si l'antioxydant est solubilisé dans les micelles de tensio-actifs, il n'est plus concentré ni dans la phase aqueuse ni à l'interface et devient ainsi inactif. Dans le cas des tensio-actifs non ioniques, les composés apolaires sont solubilisés dans les micelles et fusionnent avec les gouttelettes lipidiques. Par conséquent, ils ne sont pas concentrés à l'interface (Pena and Miller, 2006). L'influence du tensio-actif a également été décrit avec les rosmarinales d'alkyle en émulsion huile de soja/eau stabilisée avec du Tween 20. Les rosmarinales de butyle, octyle et dodécyle sont de meilleurs antioxydants que l'acide rosmarinique, les rosmarinales d'octadécyle et d'eicosyle. La chute de l'activité antioxydante de l'eicosyle rosmarinate (C20) semble être liée à sa solubilisation dans les micelles de tensio-actif (Tween 20) qui limitent sa concentration à l'interface (Panya *et al.*, 2012).

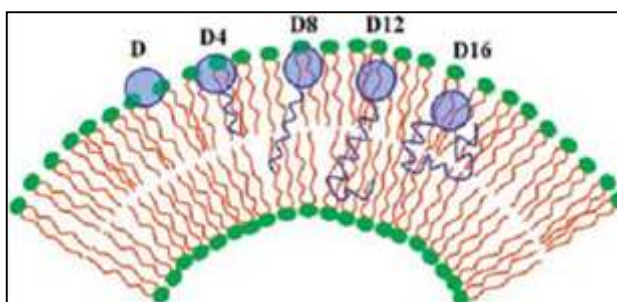
Ces études montrent que l'activité antioxydante des phénolipides en émulsion dépend de deux facteurs. Premièrement, les propriétés intrinsèques de chaque molécule (logP, CMC) déterminent leur capacité à diminuer la tension interfaciale et leur localisation à l'interface huile/eau. Deuxièmement, le type de tensio-actif utilisé peut émulsionner les antioxydants lipophilisés et ainsi limiter leur efficacité à l'interface. Une bonne protection des émulsions contre l'oxydation est attribuée à une meilleure affinité de l'antioxydant avec l'interface qui forme une couche protectrice autour des gouttelettes lipidiques.

## **2.3 Activité antioxydante des phénolipides dans des liposomes**

Il y a plus de 20 ans, Kagan *et al.* (1990) ont montré que l'activité antioxydante de l'ubiquinol variait avec la longueur de la chaîne isoprénoïde dans des microsomes de foie de rat, dans les synaptosomes de cerveaux et dans les mitochondries. Cependant, en phase homogène, la longueur de la chaîne alkyle n'affecte pas les propriétés antioxydantes de l'ubiquinol. Toutefois, dans des systèmes biphasiques tels que les liposomes, les courtes chaînes (de un à quatre atomes de carbone) sont plus efficaces que les chaînes plus longues (de cinq à dix atomes de carbone). Cette diminution des capacités antioxydantes des esters d'ubiquinol semble provenir de leur différence de distribution et de mobilité dans la membrane. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle a également été mise en évidence pour les esters d'acide ascorbique dans des liposomes de phosphatidylcholine de soja. Takahashi *et al.* ont montré, avec une série de diesters d'acide ascorbique, que le dicaprylate était plus actif que le dipalmitate, lui-même plus efficace que le distéarate pour limiter l'oxydation de l'alpha-tocophérol (Takahashi *et al.*, 1992). L'étude des propriétés antioxydantes des férulates et gallates a également montré que l'activité antioxydante était améliorée jusqu'à une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone. Au-delà de cette longueur, l'activité antioxydante avait diminué (Kikuzaki *et al.*, 2002).

L'une des explications de l'effet «cut-off» dans les liposomes passe par la capacité des antioxydants à s'ancrer dans la bicouche lipidique. En effet, les flavonoïdes et les iso-flavonoïdes sont capables d'interagir et de pénétrer dans la bicouche phospholipidique. Leur localisation à l'interface lipide/eau diminue la fluidité membranaire et limite la diffusion de radicaux libres à travers la membrane. Ainsi, ils exercent un effet protecteur contre la peroxydation lipidique (Arora *et al.*, 2000). Plus récemment, la corrélation entre la fluidité membranaire et l'activité antioxydante a été étudiée avec le daidzéine et ses dérivés alkoxyles dans des liposomes (An *et al.*, 2011). Le daidzéine (D) et le 7-butyloxy-daidzéine (D4) exercent un effet pro-oxydant par rapport aux 7-octyloxy (D8), 7-dodecyloxy (D12) et 7-hexadecyloxy (D16) daidzéine qui ont un effet antioxydant. La lipophilisation semble donc diminuer les propriétés pro-oxydantes du daidzéine. L'étude de la fluidité membranaire a été déterminée avec une sonde fluorescente, la 16-AP (16-(6-anthroyloxy) acide palmitique). D16, D12, D8, D4 engendrent une augmentation de la fluorescence de la sonde 16-AP, qui indiquent une diminution de la fluidité membranaire.

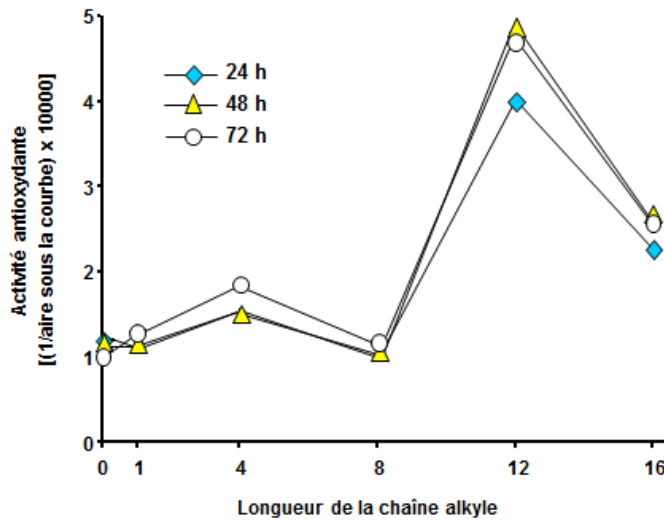
L'activité antioxydante maximale est obtenue avec D8 et D12 qui adoptent une conformation optimale au sein de la membrane, alors que la chaîne alkyle du D16 tend à se replier, limitant ainsi sa mobilité et ses capacités à stabiliser la membrane (**figure 22**). La balance entre la capacité à protéger la surface du liposome contre l'attaque des radicaux libres dans la phase aqueuse et la modulation de la fluidité membranaire semblent donc être deux paramètres importants associés à l'activité antioxydante.



**Figure 22 : Localisation du daidzéine et de ses esters alkoxyles dans la bicouche lipidique d'un liposome. D'après An *et al.*, 2011**

## 2.4 Activité antioxydante des phénolipides en milieu cellulaire

L'activité antioxydante des phénolipides sur culture cellulaire est également un phénomène non linéaire. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle a été étudiée sur un premier modèle cellulaire : les fibroblastes du derme humain modifiés génétiquement afin de produire des quantités élevées d'EROs. L'activité antioxydante des composés a été déterminée par rapport à leur capacité à inhiber l'oxydation d'une sonde cytoplasmique qui fluoresce lorsqu'elle est oxydée, la diacétate dihydrochlorofluoréscine (DCFH<sub>2</sub>-DA). Le traitement des fibroblastes avec les chlorogénates d'alkyle a montré que le chlorogénate de dodécyle était plus efficace pour neutraliser les EROs que ses homologues à courtes ou longues chaînes (**figure 23**) (Laguerre *et al.*, 2011).



**Figure 23 : Activité antioxydante des chlorogénates d'alkyle sur fibroblastes humains.**  
D'après Laguerre *et al.*, 2011

Tofani *et al.* (2010) ont généré un stress oxydant sur des cellules musculaires de rat de la lignée L6 en les traitant par l'hydroperoxyde de cumène, et ont mesuré la quantité d'EROs avec la sonde DCFH<sub>2</sub>-DA. Ces auteurs ont observé le même effet non linéaire que celui obtenu avec les esters d'hydroxytyrosol utilisés comme agent antioxydant. Le composé le plus actif était le hydroxytyrosol de décyle. Cet effet «cut-off» n'est pas spécifique des composés phénoliques puisqu'il est aussi observé avec des esters d'alkyle d'acide ascorbique sur des cellules Caco-2 (cellules épithéliales intestinales). La peroxydation lipidique induite par le sulfate de fer (FeSO<sub>4</sub>) est mesurée avec une sonde fluorescente sensible à l'oxydation, la BODIPY C11 581/591. Ces expérimentations ont montré que les ascorbates de dodécyle et tétradécyle sont plus efficaces que l'acide ascorbique et ses esters de décyle, d'hexadécyle et d'octadécyle pour protéger les membranes contre l'oxydation (Kimura *et al.*, 2003).

Ces séries de phénolipides ont par la suite été évaluées dans plusieurs domaines en mesurant leur activité chélatrice et leur corrélation avec les dommages à l'ADN avec la série d'esters d'alkyle d'acide caféique par exemple (Kitsati, *et al.* 2012) et les activités antioxydantes dans différents environnements qui fera l'objet de cette dernière partie.



## 2.5 L'effet «cut-off»

Ces dernières années, il a été montré que la lipophilisation d'antioxydants n'était pas toujours efficace en émulsion, dans des liposomes ou sur culture cellulaire. Plusieurs études regroupées dans deux revues (Shahidi and Zhong, 2011 ; Laguerre *et al.*, 2012) ont montré que la corrélation entre l'activité antioxydante et l'hydrophobie n'était pas linéaire. En effet, la lipophilisation de composés phénoliques comme l'acide chlorogénique ou rosmarinique est maximale avec une longueur de chaîne alkyle à 12 atomes de carbone. Cet effet non linéaire a été largement décrit dans plusieurs domaines biologiques tels que les activités antimicrobiennes (Devínsky *et al.*, 1990 ; Aissa *et al.*, 2012) anesthésiantes ou cytotoxiques (Locatelli *et al.*, 2008). Dans le cas de l'activité antioxydante des phénolipides, trois hypothèses ont été mises en avant mettant en cause l'internalisation, la mobilité ou les propriétés d'agrégaions des phénolipides. Cependant, en fonction de l'environnement de l'antioxydant (émulsion ou dans des liposomes), ces trois paramètres sont influencés de manière différente.

L'internalisation des phénolipides dépend de leur capacité à se localiser à l'interface lipide/ eau. Plus la longueur de la chaîne alkyle augmente plus l'hydrophobie de la molécule est importante. Il en résulte un changement des propriétés physico-chimiques de l'antioxydant. Ainsi, dans les émulsions, les esters à chaînes moyennes ont une meilleure affinité avec l'interface huile/ eau alors que les composés très apolaires sont solubilisés dans les gouttelettes lipidiques. De plus, en raison de leur propriété amphiphile et en fonction de leur concentration, ils peuvent s'assembler sous forme de micelles dans la phase aqueuse. Cette organisation micellaire qui diminue leur interaction avec l'interface huile/eau est accentuée avec l'utilisation de tensio-actifs. L'hypothèse de l'auto-agrégation dépend donc également des propriétés tensioactives des phénolipides. Plus la valeur de logP est élevée, plus la valeur de la CMC est basse. Ainsi, en fonction de la concentration, les phénolipides possédant les plus longues chaînes alkyles peuvent s'agréger. Ceci engendre une diminution de leur mobilité, une diminution de leur concentration à l'interface huile/eau et par conséquent une chute de leur activité antioxydante. Dans le cas des liposomes, la longueur de la chaîne alkyle n'affecte pas directement l'internalisation des phénolipides mais leur mobilité et la fluidité de la membrane. En

effet, un repliement de la partie hydrophobe du phénolipide réduit sa mobilité au sein de la bicouche lipidique limitant son interaction avec l'interface.

A ce jour, le mécanisme d'action conduisant à l'effet «cut-off» n'a toujours pas été élucidé en milieu cellulaire. Par conséquent, l'objectif principal de ce travail de thèse a été de comprendre ce mécanisme en étudiant le comportement des rosmarinates d'alkyle sur des fibroblastes de derme humain modifiés.

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

## 1 Matériels

Les sources commerciales des réactifs chimiques et enzymes fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) utilisés dans ces travaux sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (**tableau 1**).

**Tableau 1 : Référence des réactifs chimiques et des enzymes fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France)**

Réactifs et enzymes	Référence
Butanone	360473
Acétate d'éthyle	319902
Acide formique	06450
Acide hydroxyéthylpipérazineéthane (HEPES)	H4034
Acide phosphorique	215104
Acide Rosmarinique	536954
Amberlite 15 wet	216399
Amberlite IR 120 H	216534
Acétonitrile	34967
Butanol	281549
Butanone	34861
Lipase de <i>Candida antarctica B</i> (Novozyme 435)	L4777
Carbonate de sodium	451614
Chlorure de calcium	C2661
Chlorure de magnésium	M8266
Chlorure de potassium	P9541
Chlorure de sodium	S5886
Décanol	239763
Diisopropyl azodicarboxylate	225541
Diméthyl sulfoxide	D8418
Dodécanol	443816
Dulbecco's modified Eagle's medium (4.500 g/L glucose)	D6429
Dulbecco's modified Eagle's medium (4.500 g/L glucose) sans rouge de phénol	D1145

Ester méthylique d'acide octanoïque	260673
Ester méthylique d'acide pentanoïque	W275204
Éthanol	676829
Ether diéthylique	309966
Hexadécanol	258741
Hexane	52765
Hoechst 32258	14530
Iodure de propidium	P4170
Isopropylidène glycérol	59445
L-Acide ascorbique	A5960
Laurate de vinyle	61725
Méthanol	525102
Octadécanol	74720
Octanol	297887
PBS	319252
Silica gel 60 Å, 63-200 µm	391484
Solution de trypsine (0,025 µM)	T4049
Stéarate de Vinyle	436208
Sulfate de sodium anhydre	71961
Tamis moléculaire	69834
Tétrahydrofurane anhydre	401757
Toluène	412642
Triphénylphosphonine	93090
α Tocophérol	T3251

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC ou analytique.

La sonde Diacétate 2',7'-dichlorodihydrofluoréscine (référence : D399), le MitoTracker® Red CMXRos (référence : M7512) sont fournis par Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Le Kit cytotox one (référence : G7890) est fourni par Promega (Charbonnières, France).

Composition du tampon Locke : NaCl 140 mM, KCl 5 mM,  $MgCl_2$  1,2 mM,  $CaCl_2$  1,8 mM, Glucose 10 mM, HEPES 10 mM, TRIS 5 mM. Ajouter la quantité d'eau milliQ puis ajuster le pH à 7,2 avec une solution TRIS à 100mM.

Les microplaques 96 puits UVstar (référence : W18297) et les microplaques 96 puits noirs/PS (référence : W1792D) sont fournis par Fischer Bioblock Scientific (Ullric, France). Les microlames huit puits (référence : 80826) sont fournis par Biovalley (Marne la vallée, France).

## **2 Méthodes**

### **2.1 Synthèse des dérivés lipidiques d'acide rosmarinique**

#### **2.1.1 Synthèse des rosmarinates d'alkyle**

L'estérification de l'acide rosmarinique s'effectue à l'abri de la lumière par catalyse acide (Amberlite IR 120 H, préalablement séchée à 110 °C pendant 6h) avec un excès molaire d'alcool gras précisé ci-dessous.

Dans le cas des alcools gras les plus apolaires, ils sont placés dans une étuve de marque Memmert (Schwabach, Allemagne) à 57 °C jusqu'à fusion complète. De plus, l'acide rosmarinique, insoluble dans l'alcool gras, est solubilisé préalablement dans 10 mL de THF pour favoriser les interactions entre les deux substrats.

Dans un flacon de 100 mL, 1,5 g d'acide rosmarinique (4 mmol) est solubilisé dans 50 mL de méthanol (124 mmol), de butanol (760 mmol), d'octanol (450 mmol), de décanol (370 mmol), de n-dodécanol (310 mmol), de n-hexadécanol (240 mmol) et de n-octadécanol (210 mmol). Puis, 10 g de catalyseur sont ajoutés (5% poids total des deux substrats) au milieu réactionnel, et chaque réaction est placée dans un incubateur Stuart SI50 (Stone Staffordshire, Angleterre) à 57 °C sous agitation orbitale à 250 tr/min. L'eau générée au cours de la réaction est piégée par l'ajout de tamis moléculaire (40mg/mL du milieu réactionnel). Les réactions sont suivies par chromatographie liquide haute performance (CLHP) suivant le protocole analytique décrit en section 2.1.3. Les réactions sont arrêtées lorsque la conversion est totale ou que l'équilibre est atteint.

### 2.1.2 Purification des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique

Une fois la réaction terminée, le catalyseur est retiré par filtration à travers un filtre en microfibres de verre de 1,6  $\mu\text{m}$  (Whatman international Ltd., Maidston, Angleterre). Puis, en fonction de la polarité des alcools gras, deux méthodes sont employées pour les éliminer et décrites ci dessous.

En ce qui concerne l'excès de butanol, d'octanol et de décanol, une première étape de séparation par extraction liquide-liquide est effectuée en utilisant comme solvant un mélange de 500 mL d'hexane/acétonitrile (1:3, v/v). Une fois l'équilibre des phases atteint, la phase hexanique, qui contient majoritairement les alcools gras, est éliminée, tandis que la phase acétonitrile, contenant principalement les esters, est lavée encore 3 fois par 100 mL d'hexane.

L'excès d'alcools gras à 12, 16 et 18 atomes de carbone est supprimé en les précipitant à température ambiante (25 °C) dans des Erlenmeyers. Puis, le précipité d'alcool gras est lavé trois fois par 100 mL d'acétonitrile et est filtré sur Büchner.

Quel que soit le type d'alcool gras, la phase acétonitrile est ensuite concentrée à 40 °C sous pression réduite (40 mmHg) à l'aide d'un évaporateur rotatif Heidolph laborata 4000 (Schwabach, Allemagne) pour obtenir un volume final d'environ 10 mL. 10 g de silice (60Å, 63-200  $\mu\text{m}$ ) sont alors ajoutés, puis le solvant est évaporé sous vide. Les produits ainsi adsorbés sur silice sont placés dans une pré-colonne et sont purifiés une seconde fois par flash-chromatographie à l'aide d'un appareil type Combi-Flash (Teledyne Isco, USA). L'élution est réalisée à un débit de 50 mL/min sur une colonne de silice RediSep de 80g par un mélange d'hexane/éther diéthylique selon un gradient d'élution indiqué **Tableau 2**. La séparation des constituants est suivie par détection UV à 328 nm et des fractions de 10 mL sont collectées et analysées par CCM couplée à la densitométrie. Pour cela, 10  $\mu\text{L}$  de chacune des fractions collectées sont déposés sur une plaque de silice (TLC Silica gel 60, 10x20 cm, Merck, Allemagne), élués par un mélange toluène/acétate d'éthyle/acide formique (5:4:1, v/v/v), puis scannés à 328 nm à l'aide d'un densitomètre CAMAG TLC-scanner 3 (Muttenez, Suisse). Les fractions contenant les rosmarinates d'alkyle sont regroupées et le solvant évaporé sous vide.

**Tableau 2 : Gradient de purification des esters d'alkyles de l'acide rosmarinique**

Temps (min)	0	4	29	43	45	60
Hexane (%)	90	90	70	10	0	0
Ether diéthylique (%)	10	10	30	80	100	100

### 2.1.3 Suivi des synthèses des esters de l'acide rosmarinique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'appareil utilisé est une chaîne chromatographique Dionex U3000 (Jouy en Josas, France). Les solvants d'élution sont le méthanol et une solution aqueuse d'acide phosphorique (3 mM). La phase stationnaire est une colonne de phase inverse ACE C18, de dimensions 4,5x250 mm et de taille des particules de 5 µm, fournie par AIT France (Houilles, France). Le débit est programmé à 1 mL/min. La détection est effectuée dans le domaine de l'UV à la longueur d'onde de 328 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  de l'acide rosmarinique). Le gradient utilisé pour la séparation chromatographique de l'acide rosmarinique et de ses esters a été le suivant (**tableau 3**).

**Tableau 3 : Gradient d'élution employé pour la séparation chromatographique de l'acide rosmarinique et de ses esters**

<b>Temps (min)</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>55</b>
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3 mM) (%)</b>	95	25	0	0	95
<b>Méthanol (%)</b>	5	75	100	100	5

Les esters sont séparés en fonction de leur polarité. Les temps de rétention sont récapitulés dans le **tableau 4**.



**Tableau 4 : Temps de rétention des rosmarinates d'alkyle**

	Temps de rétention (min)
Acide rosmarinique	19,3
Rosmarinate de méthyle	21,5
Rosmarinate de butyle	25,3
Rosmarinate d'octyle	29,7
Rosmarinate de décyle	31,19
Rosmarinate de dodécyle	32,8
Rosmarinate d'hexadécyle	34,4
Rosmarinate d'octadécyle	35,48

#### 2.1.4 Synthèse des rosmarinates de diacylglycérol

La synthèse des rosmarinates de diacylglycérol se déroule en trois étapes :

##### Etape 1 : Estérification de Mitsunobu

Dans un ballon de 50 mL, un équivalent d'acide rosmarinique (1,401 mmol) et 2,5 équivalents de 1,2-O-isopropylidène glycérol (3,503 mmol) sont solubilisés dans 5 mL de THF anhydre. Après l'addition de 2 équivalents de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (2,80 mmol), 2 équivalents de triphénylphosphonine ( $\text{PPh}_3$ ) (2,80 mmol) solubilisées dans 5 mL de THF anhydre sont ajoutées goutte à goutte (1 mL/min) dans le milieu réactionnel mis dans un bain de glace et inerté sous azote. Le milieu réactionnel est ensuite placé dans un incubateur stuart SI50 (Stone Staffordshire, Angleterre) à 40 °C sous agitation orbitale (250 tr/min). Les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un densitomètre (section 2.1.5).

Lorsque le taux d'avancement atteint environ 50%, 0,5 équivalent de  $\text{PPh}_3$  (0,70 mmol) et de DIAD (0,70 mmol) sont additionnés au milieu réactionnel.

Après 18 heures, la réaction est arrêtée, puis le THF du milieu réactionnel est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le milieu réactionnel est ensuite

solubilisé dans 30 mL d'acétate d'éthyle puis est successivement lavé deux fois avec 20 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), puis avec deux fois 20 mL d'une solution de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ), deux fois avec 20 mL d'eau distillée et enfin séchée sur sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). La phase organique est alors concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir un volume final d'environ 10 mL. 10 g de silice (60 Å, 63-200  $\mu\text{m}$ ) sont alors ajoutés, puis le solvant est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les produits ainsi adsorbés sur silice sont placés dans une pré-colonne et sont purifiés par flash-chromatographie à l'aide d'un appareil type Combi-Flash (Teledyne Isco, USA). L'élution est réalisée avec un débit de 30 mL/min sur une colonne de silice RediSep (Serlabo technologies, France) de 40 g par un mélange d'hexane/acétate d'éthyle selon un gradient linéaire de 80% d'hexane à 100% d'acétate d'éthyle en 25 min. La séparation des constituants est suivie par détection UV à 328 nm et des fractions de 10 mL sont collectées. Celles contenant les esters sont évaporées (obtention d'une poudre blanche) et analysées par CLHP pour vérifier l'absence de l'acide rosmarinique et la formation de nouveaux composés (section 2.1.3).

## **Etape 2 : Déprotection du groupement isopropylidène**

La réaction s'effectue à l'abri de la lumière. Dans un flacon ambré de 250 mL, le produit synthétisé lors de la précédente étape (100 mg) est dissout dans 50 mL de méthanol. 60 mg d'Amberlite 15 Wet sont ajoutés, et le mélange réactionnel est placé dans un incubateur Stuart SI50 (Stone Staffordshire, Angleterre) à 40 °C sous agitation orbitale (250 tr/min) jusqu'à conversion totale (4 heures). Le catalyseur est ensuite éliminé par filtration (microfibre de verre de 1,6  $\mu\text{m}$ ), et le méthanol est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le rosmarinate de glycérol obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle (91,2 mg, 0,21 mmol) est analysé par CLHP (section 2.1.3) et identifié par spectrométrie de masse (section 2.1.6).

### Etape 3 : Lipophilisation du rosmarinate du diacylglycérol

Les réactions de lipophilisation sont toutes catalysées enzymatiquement par la lipase de *Candida antarctica* B immobilisée (Novozyme 435). L'enzyme est incubée sous vide pendant deux semaines à 25 °C dans un dessiccateur en présence d'une solution de sel saturée de chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) afin d'équilibrer l' $a_w$  de l'enzyme à celle du sel de référence ( $a_w = 0,33$ ). La détermination de l' $a_w$  de l'enzyme à l'équilibre a été effectuée dans le système GBX aqualab Fa-st/1 (Romans, France).

Les chaînes courtes à cinq et huit atomes de carbone sont greffées à partir des esters de méthyle d'acide pentanoïque et d'acide octanoïque. Dans un flacon ambré de 50 mL, six équivalents d'esters méthyliques d'acides gras (4,1 mmol) sont ajoutés à 1 équivalent de rosmarinate de glycérol (0,65 mmol), préalablement solubilisé dans 30 mL d'un mélange toluène/butanone (50:50, v/v). L'enzyme (20% en poids total des substrats) est ensuite additionnée au milieu réactionnel. La réaction s'effectue dans un incubateur Stuart SI50 à 55 °C et sous agitation orbitale (250 tr/min).

Les donneurs d'acyle à 12 et 18 atomes de carbone sont le laurate de vinyle et le stéarate de vinyle. Dans des flacons ambrés de 50 mL, six équivalents d'acides gras de vinyle (1,26 mmol) sont ajoutés à 1 équivalent de rosmarinate de glycérol (0,21 mmol), préalablement solubilisé dans 10 mL d'un mélange hexane/butanone (30:70, v/v). 15% en poids total des substrats de l'enzyme sont incorporés au milieu réactionnel. Le mélange est placé dans un incubateur Stuart SI50 à 55 °C sous agitation orbitale (250 tr/min).

Toutes les réactions sont suivies par CCM couplée à la densitométrie (section 2.1.5). Les réactions sont arrêtées en éliminant le catalyseur par filtration (microfibre de verre de 1,6  $\mu\text{m}$ ). La phase organique est alors concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir un volume final d'environ 10 mL. 10 g de silice (60 Å, 63-200  $\mu\text{m}$ ) sont alors ajoutés, puis le solvant est évaporé sous vide. Les produits ainsi adsorbés sur silice sont placés dans une pré-colonne et sont purifiés par flash-chromatographie à l'aide d'un appareil type Combi-Flash (Teledyne Isco, USA). L'élution est réalisée avec un débit de 15 mL/min sur une colonne de silice RediSep (Serlabo Technologies, France) de 12 g par un mélange d'hexane/acétate d'éthyle selon un gradient linéaire de 100% d'hexane à 100% d'acétate d'éthyle en 25 min. La séparation des constituants est suivie par détection UV à 328 nm et des

fractions de 10 mL sont collectées. Celles contenant les esters sont évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif (obtention d'une huile), identifiés par spectrométrie de masse (APCI-) (section 2.1.6) et caractérisés par RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (section 2.1.7).

### 2.1.5 Suivi des synthèses d'esters de l'acide rosmarinique par densitométrie

Pour chaque étape de la synthèse des rosmarinates de diacylglycérol, le suivi cinétique est réalisé par densitométrie.

10 µL du milieu réactionnel sont déposés sur une plaque de silice (TLC Silica gel 60, 10x20 cm, Merck, Allemagne), élués par un mélange toluène/acétate d'éthyle/acide formique (5:4:1, v/v/v) dans une cuve automatique CAMAG ADC2 (Muttenz, Suisse) programmée pour atteindre un front de solvant à 85 mm puis scannés à 328 nm à l'aide d'un densitomètre TLC-scanner 3 (CAMAG, Suisse). Les rapports frontaux des esters lipophilisés obtenus sont les suivants (**tableau 5**).

**Tableau 5 : Rapport frontal des réactifs et des produits de la synthèse des rosmarinates de diacylglycérol par densitométrie à 328 nm**

Composés	R <sub>f</sub>
Acide rosmarinique	0,55
rosmarinate d'isopropylidène de glycol	0,66
rosmarinate de glycérol	0,07
1 rosmarinoyl 2,3 dipentanoyl glycérol (RDAG <sub>5</sub> )	0,29
1 rosmarinoyl 2,3 dioctanoyl glycérol (RDAG <sub>8</sub> )	0,48
1 rosmarinoyl 2,3 dilauroyl glycérol (RDAG <sub>12</sub> )	0,58
1 rosmarinoyl 2,3 dioctadécanoyl glycérol (RDAG <sub>18</sub> )	0,69

### **2.1.6 Identification par spectrométrie de masse des esters de l'acide rosmarinique**

Après purification, l'identification des esters lipophilisés de l'acide rosmarinique a été confirmée par spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse utilisé est équipé d'une trappe d'ions quadripôle, une source d'ionisation externe opérant à pression atmosphérique (APCI), et avec un système d'injection intégré (Thermo Finnigan Serie LCQ, San José CA, USA). Les esters lipophilisés de l'acide rosmarinique sont préalablement solubilisés dans du méthanol à 10 mg/L. Puis, les solutions sont injectées, par infusion, à l'intérieur d'une source d'ionisation par nébulisation qui opère en conditions de fragmentation négative à un débit de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . L'acquisition des données a été faite en mode balayage. Les conditions opératoires sont :

- Ionisation : APCI -
- Voltage d'ionisation : 4,54 kV
- Température du capillaire : 300 °C
- Débit du gaz « sheath » (azote), en unités arbitraires : 20

Les masses obtenues sont rassemblées dans le chapitre Résultats et Discussion.

### **2.1.7 Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les analyses RMN des rosmarinates de diacylglycérol sont réalisées à l'Université Montpellier I par Thierry Durand et Laurence Balas de l'UMR IBMM<sup>1</sup> ; l'appareil utilisé est une RMN Bruker AMX 300 (Ettlingen, Allemagne). Les composés sont solubilisés dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ), et les analyses sont effectuées à 303 K.

---

<sup>1</sup> IBMM : Institut des Biomolécules Max Mousseron

Les principales expériences qui ont été utilisées pour la détermination de la structure des composés isolés sont les suivantes :

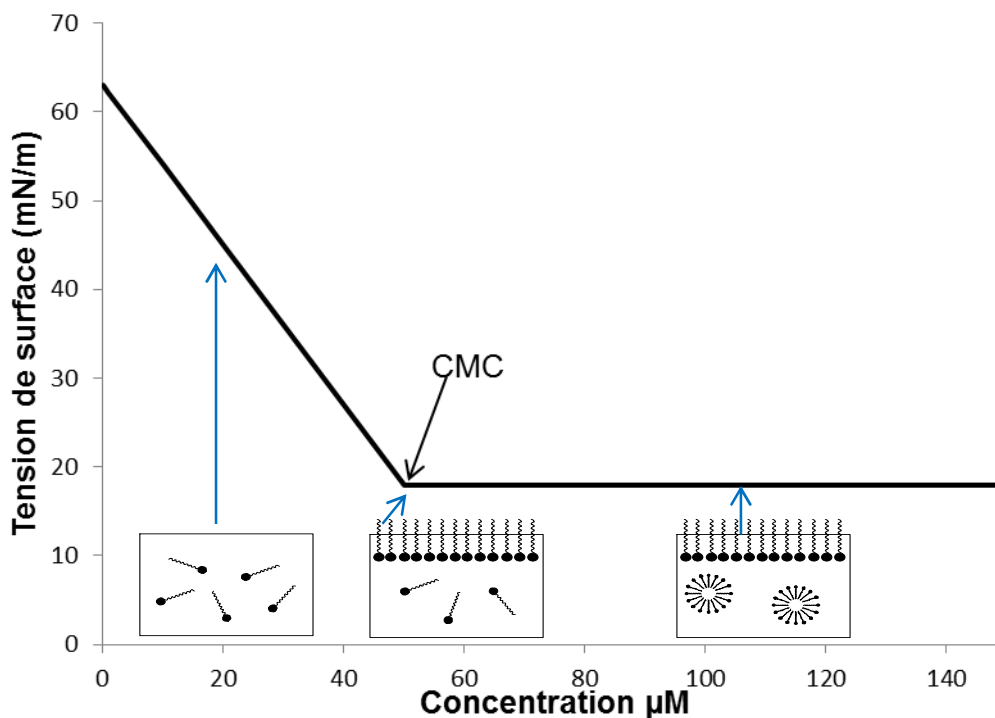
- La RMN à une dimension permet de connaître la position (déplacement chimique) et l'intensité des signaux correspondant aux noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .
- La RMN bidimensionnelle permet d'observer des couplages, homonucléaires JH-H ou hétéronucléaires JC-H entre les noyaux couplés scalairement.
- La HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) exploite les couplages à longues distances, essentiellement  $^2\text{J}$   $^3\text{J}$  et permet de déterminer les corrélations entre les protons et les carbones.

Les structures chimiques sont rassemblées dans le chapitre Résultats et Discussion.

## 2.2 Détermination des propriétés physico-chimiques

### 2.2.1 Concentration micellaire critique

Les esters d'alkyle de l'acide rosmarinique sont des molécules amphiphiles. L'une de leurs caractéristiques est donc de s'organiser en micelles lorsqu'elles sont solubilisées dans une phase aqueuse. Ce phénomène de micellisation n'apparaît qu'à partir d'une concentration micellaire critique (CMC). En effet, pour des faibles concentrations, les molécules sont présentes sous forme de monomères. Puis, une fois la CMC atteinte, la phase aqueuse et l'interface air/eau sont saturées de monomères. Ainsi, la tension de surface ( $\gamma$ ) ne peut plus être abaissée, ce qui engendre la formation de micelles. Par conséquent, la mesure de ce paramètre en fonction de la concentration du composé permet de déterminer sa concentration micellaire critique (**figure 24**).



**Figure 24 : Comportement des molécules amphiphiles à l'interface air/ eau dans une phase aqueuse et en fonction de leur concentration**

Les mesures de tension de surfaces sont déterminées avec un tensiomètre à goutte TRACKER (TECLIS, France). Chaque mesure est effectuée à 37 °C dans une solution aqueuse où l'interface air/eau est créée avec une goutte montante d'air.

Dans un premier temps, la tension superficielle de référence est mesurée par une solution sans tensioactif tamponnée à pH 7,2 (PBS). La valeur obtenue est de 72 mN/m.

Dans un second temps, différentes solutions éthanoliques de concentrations comprises entre 0,5 et 20 mM de rosmarinat de décyle ( $R_{10}$ ) sont préparées puis diluées au 1/1000 dans un tampon phosphate à pH=7,2 (PBS). Lorsque le système est à l'équilibre (20 minutes), la tension de surface de chaque solution est déterminée en fonction du temps. Puis, à partir de ces résultats, la courbe tension  $\gamma$  (mN/m) en fonction de la concentration (µM) est tracée. La CMC est ainsi calculée au point d'intersection des deux droites (figure 24).

### **2.2.2 Mesure de la taille des particules des rosmarinales d'alkyle par la diffusion dynamique de la lumière (DLS)**

La taille et la distribution des particules des rosmarinales d'alkyle a été mesurée avec un Zetasizer Malvern Instruments LTD de type 3000 HS (Worcestershire, Grande Bretagne).

Cet appareil évalue la diffusion dynamique de la lumière et permet ainsi de mesurer la taille moyenne ou le diamètre hydrodynamique des particules solubilisées dans un liquide. Le principe de la mesure est basé sur le mouvement brownien des molécules. Par conséquent, pour ne pas biaiser les mesures, le tampon Locke (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM d'acide hydroxyéthylpipérazineéthane (HEPES)) ou le DMEM sans rouge de phénol (SRP) est préalablement filtré à 0,2 µM pour s'assurer de l'absence de poussière.

Une solution éthanolique à 25 mM de chaque rosmarinate d'alkyle est préparée puis diluée au 1/1000 soit dans le tampon Locke soit dans le DMEM SRP. Dans le cas du rosmarinate d'octadécyle, la taille des particules est mesurée à plusieurs concentrations (0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 µM) dans le DMEM SRP en raison d'une mauvaise solubilisation de l'ester.

Chaque solution est introduite dans le nano zetasizer préalablement chauffé à 37°C. Les résultats obtenus sont la moyenne de 10 mesures.

## **2.3 Stabilité hydrolytique des rosmarinales d'alkyle**

L'hydrolyse de l'acide rosmarinique et des rosmarinales d'alkyle peut engendrer la formation d'acide caféique et d'acide rosmarinique. Ainsi, la résistance à l'hydrolyse de chaque composé dans les conditions opératoires choisies pour leur efficacité antioxydante (modèle cellulaire) a été évaluée par CLHP (section 2.1.3).

Des solutions éthanoliques à 25 mM d'acide rosmarinique et de ses esters sont diluées au 1000<sup>ème</sup> dans du PBS à pH 7,2 dans des flacons ambrés de 1,8 mL et incubées à 37 °C pendant 24 heures. 25 µL de chaque solution sont ensuite injectés en CLHP (section 2.1.3).



## 2.4 Activité antioxydante

Les cultures cellulaires sont réalisées sur des fibroblastes du derme humain modifiés génétiquement pour accroître la production d'espèces oxydantes d'origine mitochondriale (Grandemange *et al.*, 2005). Ces cellules ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et 100% d'humidité. Le milieu de culture est constitué de DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 µg/mL de gentamicine et 50 µg/mL d'amphotéricine B.

Pour chaque essai, des solutions éthanoliques des dérivés de l'acide rosmarinique et des vitamines E et C sont préparées à des concentrations de l'ordre du millimolaire puis diluées au 1/1000 dans le milieu de culture (tampon Locke, DMEM SRP, DMEM supplémenté en sérum). Elles sont ensuite ajoutées sur les cellules après 24 heures d'ensemencement.

L'activité antioxydante des composés testés est déterminée via la mesure des espèces radicalaires de l'oxygène (EROs) sur trois passages cellulaires différents et en triplicat, selon la méthode décrite ci-dessous.

### 2.4.1 Mesure des espèces oxydantes par la sonde diacétate de 2',7-dichlorodihydrofluoréscine

Les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs) sont déterminées via l'oxydation d'une sonde cytoplasmique, la diacétate de 2',7-dichlorodihydrofluoréscine (DCFHH<sub>2</sub>-DA). Cette sonde est un dérivé non fluorescent de la 2',7-dichlorofluoréscine. Une fois internalisée, la fonction ester est hydrolysée par des estérases pour générer la 2',7-dichlorodihydrofluoréscine. Cette dernière est oxydée par les espèces oxydantes en 2',7-dichlorofluoréscine qui fluoresce ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 485 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  : 530 nm) (Royall and Ischiropoulos, 1993). Les capacités antioxydantes des composés sont donc corrélées directement à leur capacité à inhiber l'oxydation de la 2',7'-dichlorodihydrofluoréscine (DCFH<sub>2</sub>).

Les cellules sontensemencées dans des microplaques (UVstar) à fond plat et transparent à une densité cellulaire de 10500 cellules par puits dans 100 µL de milieu de culture. Après 24h d'ensemencement, 100 µL des différentes solutions de

phénolipides sont ajoutées pour obtenir des concentrations finales de 0,5 ; 2,5, 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu\text{M}$ . Les cellules sont traitées pendant 24h. Le milieu de culture est ensuite retiré, et chaque puits est lavé deux fois avec soit 50  $\mu\text{L}$  de DMEM SRP soit 50  $\mu\text{L}$  de tampon Locke pour éliminer le rouge de phénol.

Le bruit de fond est mesuré à l'aide d'un spectrofluorimètre, Synergy 2 BioTek, Bio-tek Instruments, Inc., (Winooski, USA).

Puis, les cellules sont incubées avec 100  $\mu\text{L}$  d'une solution à 10  $\mu\text{M}$  de DCFHH<sub>2</sub>-DA dans le DMEM SRP pendant 20 minutes à 37 °C et à l'abri de la lumière. Après avoir éliminé la sonde par retournement, pour éviter le décollement des cellules, chaque puits est lavé deux fois avec 50  $\mu\text{L}$  de DMEM SRP. Les cellules sont à nouveau incubées 5 minutes à 37 °C.

La fluorescence brute du DCF est mesurée par spectrofluorimétrie. La fluorescence de l'échantillon est calculée en soustrayant la fluorescence du bruit de fond (cellules sans sonde) à celle de la fluorescence brute (équation 1).

$$(\text{Eq. 1}) \text{ Fluo}_{\text{échantillon}} = \text{Fluorescence (brute)} - \text{Fluorescence (bruit de fond)}$$

Suite à ces mesures, le milieu de culture est retiré et les microplaques sont conservées à -20 °C pour quantifier la quantité d'ADN ultérieurement (section 2.4.3).

Après cette quantification de l'ADN, les valeurs de fluorescence sont ensuite normalisées à la quantité d'ADN exprimée en  $\mu\text{g}$  d'ADN/puits en utilisant l'équation 2.

$$(\text{Eq. 2}) \text{ Fluo}_{\text{normalisée}} = \text{Fluo}_{\text{échantillon}} / \text{Quantité d'ADN (en } \mu\text{g) par puits}$$

## 2.4.2 Cinétique de la production d'EROs pendant deux heures

La cinétique de la production d'EROs est effectuée selon la même méthode décrite précédemment à la différence que les composés phénoliques sont introduits après l'incorporation de la sonde DCFH<sub>2</sub>-DA.

Les cellules sont traitées par l'acide rosmarinique et ses esters solubilisés dans le tampon Locke à 0,5 ; 5 et 25  $\mu\text{M}$  ou dans le DMEM SRP à 5 et 25  $\mu\text{M}$ . La mesure

de fluorescence de la sonde est enregistrée toutes les cinq minutes pendant deux heures à 37 °C.

Pour calculer la fluorescence au cours de la cinétique, la fluorescence normalisée (section 5.1) est divisée par la fluorescence du contrôle sans antioxydant et exprimée en pourcentage suivant l'équation 3.

$$(Eq. 3) \text{ Fluo}_{\text{cinétique}} = \text{Fluo}_{\text{normalisée}} / \text{Fluo}_{\text{normalisée du contrôle}} \times 100$$

### 2.4.3 Quantification de l'ADN par le réactif de Hoechst 33258

La quantité d'ADN par puits est mesurée en appliquant la méthode au réactif de Hoechst 33258 modifiée. Le Hoechst 33258 est un fluorochrome spécifique de l'adénine et de la thymine qui émet une fluorescence intense (~ 440 nm) lorsqu'il est fixé à l'ADN et excité à 340 nm. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Les cellules ayant servi à la mesure des EROs sont lysées (immédiatement après leur sortie du congélateur) avec 100 µL/puits d'une solution de tampon TE5N (10 Mm Tris-HCl ; pH 8 ; 0,1 mM EDTA et 0,5 M NaCl) de Triton X-100 à 0,05%. Les cellules sont incubées pendant 10 min sous agitation orbitale (200 tr/min) à température ambiante (22 °C). Après le transfert de 100 µL de chaque puits sur une microplaque noire, 100 µL/puits d'une solution de Hoechst 33258 à 0,4 µg/mL dans le TE5N sont ajoutés. L'intercalation du Hoechst dans l'ADN est effectuée à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière (papier aluminium), et la fluorescence est ensuite mesurée.

Pour déterminer la quantité d'ADN, toutes les valeurs de fluorescence sont d'abord soustraites par la valeur de fluorescence correspondante à une concentration nulle d'ADN (contrôle négatif) (équation 5).

$$(Eq 5) \text{ Fluo}_{\text{Hoechst corrigée}} = \text{Fluo}_{\text{Hoechst brute}} - \text{Fluo}_{\text{Hoechst (contrôle négatif)}}$$

La concentration en ADN est ensuite calculée par une courbe d'étalonnage d'ADN de sperme de saumon (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 µg/mL de TE5N) présente sur la même microplaque (équation 6) :

(Eq. 6) Concentration en ADN ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $\text{Fluo}_{\text{Hoechst corrigée}}$  / pente de la droite étalon

La quantité d'ADN (en  $\mu\text{g}$ ) par puits est ensuite calculée en prenant en compte le volume total de solution dans un puits (200  $\mu\text{L}$ ) (équation 7).

(Eq. 7) Quantité d'ADN (en  $\mu\text{g}$ ) = (Concentration en ADN ( $\mu\text{g/mL}$ ) x 200)/1000

Cette quantité d'ADN intègre ensuite l'équation 2 de la section 2.4.1, relative au calcul de la capacité antioxydante.

## 2.5 Etude microscopie confocale et biphotonique

Pour toutes les études microscopiques, les cellules sontensemencées (30 000 cellules/ puits) sur des microlames huit puits (IBIDI) adaptées aux analyses microscopiques, et les observations sont effectuées sur cellules vivantes.

### 2.5.1 Localisation des rosmarinates d'alkyle par microscopie confocale

Le spectre de fluorescence de l'acide rosmarinique est déterminé dans un tampon phosphate à pH 7,2 et à 37 °C dans une cuve en quartz de 1cm. La longueur d'excitation maximale mesurée est de 395 nm et celle d'émission est de 450 nm.

Les études de la localisation intracellulaire des composés sont réalisées avec un microscope confocal à balayage LSM 510 META Confocal LSM 510 META, Zeiss (Le Pecq, France), équipement de la plateforme MRI<sup>2</sup>.

L'acide rosmarinique et ses esters sont excités avec le laser diode bleu à 405 nm et leur émission est détectée entre 420 et 480 nm. L'acquisition des images est effectuée avec un objectif X63 et le pinhole à 1. Le traitement des images est réalisé avec le logiciel LSM browser.

---

<sup>2</sup> MRI : Montpellier RIO Imaging

Après 24 heures d'ensemencement, les cellules sont traitées avec 25  $\mu\text{M}$  de chaque composé pendant 15, 35, 120 minutes et 24 heures dans le milieu de culture (DMEM + sérum). Le milieu est ensuite retiré, les cellules sont lavées deux fois avec 50  $\mu\text{L}$  de DMEM SRP, puis 100  $\mu\text{L}$  de ce milieu sont additionnés avant de réaliser l'acquisition.

### 2.5.2 Etude de la co-localisation mitochondriale

L'étude de la co-localisation est basée sur les propriétés de l'acide rosmarinique et de ses esters à inhiber la fluorescence d'une sonde spécifique des mitochondries : le MitoTracker® Red CMXRos (MTR), ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 543 nm /  $\lambda_{\text{em}}$  : 582-615 nm). Pour cela, le MTR est dilué dans 1 mL de tampon phosphate (pH 7,2) pour obtenir une concentration à 10  $\mu\text{M}$ , et sa fluorescence est suivie à 543 nm pendant deux minutes. Puis, 1  $\mu\text{L}$  d'une solution éthanolique d'acide rosmarinique ou de phénolipides à 10 mM est ajouté directement dans la cuve contenant le MTR.

La cinétique du rosmarinate de décyle ( $R_{10}$ ) est effectuée dans le tampon Locke et est suivie par microscopie confocale. Préalablement, les cellules sont traitées avec 10  $\mu\text{M}$  d'une solution de MTR pendant 15 minutes à 37 °C. Puis, après avoir fait l'acquisition du champ cellulaire au début de l'analyse,  $R_{10}$  est directement additionné au milieu de culture, et une image est enregistrée toutes les 2 minutes pendant 30 minutes.

*A contrario*, pour l'analyse en point fini, les cellules sont d'abord traitées avec les rosmarinates d'alkyle testés à 25  $\mu\text{M}$  pendant 2 heures, et sont lavées deux fois avec 50  $\mu\text{L}$  du DMEM SRP. Puis, les cellules sont traitées avec 10  $\mu\text{M}$  de MTR et sont incubées pendant 15 minutes. Les cellules sont à nouveau lavées deux fois avec 50  $\mu\text{L}$  de DMEM SRP pour éliminer l'excès de MTR. Les phénolipides et les mitochondries sont enfin visualisés au microscope.

### **2.5.3 Etude de la co-localisation mitochondriale par microscopie biphotonique**

La fluorescence endogène des rosmarinales d'alkyle étant faible, la localisation intracellulaire du rosmarinate de décyle à 5  $\mu\text{M}$  est réalisée par microscopie biphotonique. Contrairement, à la microscopie confocale où l'excitation est induite par un seul photon, la microscopie biphotonique est produite par deux photons et l'émission émise est uniquement dans le plan confocal. Les images obtenues sont donc plus précises.

Les cellules sont traitées de la même manière que lors de l'étude de la co-localisation par microscopie confocale mais pendant 24 heures avec le rosmarinate de décyle.  $R_{10}$  est analysé par microscopie biphotonique ( $\lambda_{\text{exc}}$  : 750 nm et  $\lambda_{\text{em}}$  : 390-465 nm), puis les mitochondries marquées par le MTR sont analysées par microscopie confocale.

## **2.6 Dosage de la concentration intracellulaire par CLHP**

Les cellules sontensemencées sur des plaques 6 puits ( $3 \times 10^5$  cellules/puits) dans un milieu de culture supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal pendant 24 heures. Le milieu de culture est retiré, puis 2 mL d'une solution de  $R_{10}$  à 25  $\mu\text{M}$  dans le DMEM SRP sont ajoutés. Après 2 heures de traitement, le milieu de culture est transvasé dans un tube conique de 15 mL, puis les cellules sont décollées avec 300  $\mu\text{L}$  de trypsine à 0,025  $\mu\text{M}$ , lavées 2 fois avec du PBS à pH 7,2. Les cellules sont ensuite transvasées dans le même tube conique précédemment utilisé, puis le milieu de culture est centrifugé pendant 5 minutes à 3000 tr/min (Beckman Coulter, Villepinte, France). Le surnageant qui contient le rosmarinate de décyle est transvasé dans un nouveau tube conique de 15 mL, puis le phénolipide est extrait par trois fois avec 5 mL d'acétate d'éthyle. Cette phase organique est ensuite évaporée dans un ballon de 50 mL à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis 1 mL de méthanol est ajouté, et la solution est introduite dans un flacon ambré de 1,8 mL. En parallèle, un contrôle sans cellule est réalisé avec une solution de  $R_{10}$  à 25  $\mu\text{M}$  dans le PBS (contrôle PBS).

La concentration extracellulaire de  $R_{10}$  est déterminée par CLHP (section 2.1.3) puis est calculée en multipliant l'aire sous le pic de l'essai avec  $R_{10}$  par 25 et divisée par l'aire sous la courbe du contrôle selon l'équation 8.

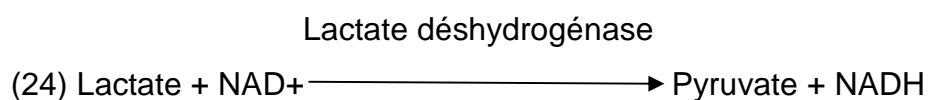
(Eq. 8) Concentration extracellulaire ( $R_{10}$ ) = 25 X (aire sous le pic (essai  $R_{10}$ )) / (aire sous le pic (contrôle PBS))

La concentration intracellulaire de  $R_{10}$  est ensuite estimée en soustrayant la concentration extracellulaire à la concentration initiale (25  $\mu$ M).

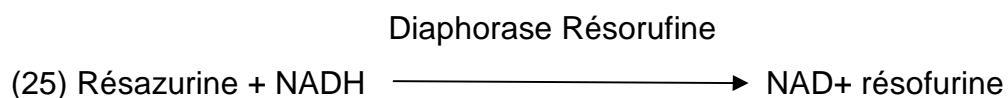
## 2.7 Cytotoxicité

### 2.7.1 Mesure de la cytotoxicité des rosmarinates en fonction de la libération de la LDH

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytoplasmique présente dans toutes les cellules de mammifères et est rapidement libérée dans le milieu extracellulaire suite à la dégradation de la membrane cytoplasmique. Plus cette quantité est importante, plus la cytotoxicité de la substance testée est élevée. La cytotoxicité a été estimée avec un kit de détection enzymatique CytoTox-ONE G7891 de la société Promega (Madison, USA) qui comporte une enzyme, la diaphorase, et trois substrats (le  $NAD^+$ , le lactate et la résazurine). Le principe de la mesure repose sur la transformation dans le milieu extracellulaire du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase, cette réaction étant couplée à la réduction du  $NAD^+$  en NADH (réaction 24).



Le NADH permet à la diaphorase de transformer la résazurine en résorufine qui est un composé fluorescent ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 560/ $\lambda_{\text{em}}$  : 590 nm) (réaction 25). Sa fluorescence est proportionnelle à la quantité de lactate déshydrogénase présente dans le milieu.



Les cellules sontensemencées dans des microplaques 96 puits noirs pendant 24 heures à 37 °C, puis sont traitées avec 25 µM de chaque phénolipide pendant 24 heures. 30 minutes avant l'évaluation de la cytotoxicité, les cellules sont équilibrées à température ambiante (22 °C).

100 µL/puits de réactif CytoTox-ONE sont ajoutés, puis les cellules sont incubées à l'abri de la lumière pendant 10 minutes à température ambiante (22 °C). 50 µL/puits de solution stop sont ensuite additionnés, et la fluorescence est immédiatement mesurée ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 560/ $\lambda_{\text{em}}$  : 590 nm). Un contrôle sans cellule est réalisé sur la même microplaque pour évaluer la fluorescence du bruit de fond.

La fluorescence corrigée est ensuite calculée en soustrayant à la fluorescence sur culture cellulaire, la fluorescence du bruit de fond du milieu (équation 9).

$$(\text{Eq. 9}) \text{ Fluo}_{\text{LDH corrigée}} = \text{Fluo}_{\text{LDH brute (avec cellules)}} - \text{Fluo}_{\text{LDH bruit de fond (sans cellule)}}$$

Par ailleurs, tenant compte du fait que les composés phénoliques sont susceptibles d'influencer la croissance cellulaire et donc d'abaisser la quantité de LDH libérée, une correction des valeurs est opérée en considérant la quantité totale de lactate déshydrogénase présente dans les milieux extra- et intracellulaires. Pour cela, un certain nombre de puits contenant des cellules est exposé à 2 µL d'une solution de lyse totale (solution de tampon phosphate à 10% de Triton X-100) destinée à libérer la totalité de la lactate déshydrogénase. Les puits de la microplaque dédiés à cette opération de lyse totale sont, par la suite, traités de la même manière que ceux n'ayant pas été exposés à cette solution de lyse. Le pourcentage de cytotoxicité d'un composé phénolique est obtenu en divisant la fluorescence corrigée sans solution de lyse par la fluorescence corrigée obtenue après lyse totale, le rapport étant finalement multiplié par 100 (équation 10).

$$(\text{Eq. 10}) \text{ Cytotoxicité} = \left[ \frac{\text{Fluo}_{\text{LDH corrigée (sans solution de lyse)}}}{\text{Fluo}_{\text{LDH corrigée (avec solution de lyse)}}} \right] \times 100$$



### 2.7.2 Cytotoxicité par cytométrie de flux

La cytotoxicité des rosmarinates d'alkyle est également déterminée en mesurant l'intégrité de la membrane plasmique. Une sonde fluorescente, l'iodure de propidium (IP), est utilisée pour évaluer la cytotoxicité des molécules ( $\lambda_{\text{exc}}$  : 488/  $\lambda_{\text{em}}$  : 585 nm). La pénétration de cette sonde dépend de l'intégrité de la membrane. En effet, plus la viabilité cellulaire est faible plus la membrane est perméable à l'IP.

La cytométrie de flux est limitée par une quantité de cellules minimales de 10 000. Ainsi, les cellules sontensemencées sur des plaques 6 puits ( $3 \times 10^5$  cellules/puits) afin d'avoir une densité cellulaire satisfaisante pour l'analyse.

Les solutions éthanoliques de l'acide rosmarinique et de ses esters à différentes concentrations (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu\text{M}$ ) sont diluées au millième dans le milieu de culture, puis 2 mL de ces solutions sont ajoutés sur les cellules. Les cellules sont traitées soit pendant 24 heures dans le milieu de culture supplémenté en sérum soit 2 heures dans le DMEM sans rouge de phénol ou dans le tampon Locke.

Le milieu de culture est ensuite prélevé et transvasé dans un tube conique à centrifugation de 15 mL, car les cellules mortes n'adhèrent plus au support. Puis, les cellules sont décollées par ajout de 500  $\mu\text{L}$  de trypsine (0,025  $\mu\text{M}$ ) et transvasées dans le même tube conique qui est centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré, et le culot cellulaire dilué dans 800  $\mu\text{L}$  d'une solution de iodure de propidium à 27  $\mu\text{g/mL}$  dans le DMEM SRP.

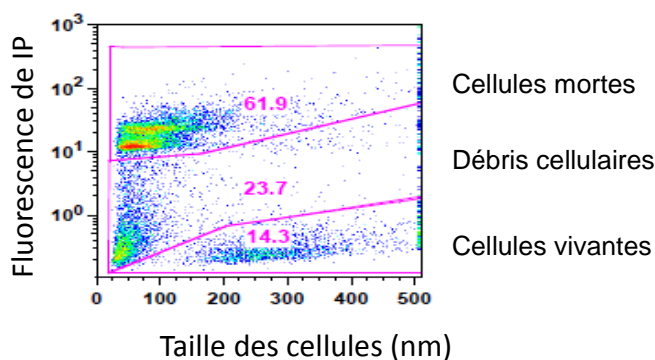
Finalement, les cellules en suspension sont analysées par cytométrie de flux avec le cytomètre Gallios de la société Beckman Coulter (Villepinte, France), appartenant à la plateforme MRI de l'IRB<sup>3</sup>. Pour chaque échantillon, la fluorescence de l'iodure propidium est mesurée sur 20 000 évènements (cellules).

Les résultats sont exprimés en fonction de deux paramètres : la taille des cellules (nm) et l'intensité de fluorescence de l'IP. Ainsi, une cellule est représentée par un point dont la couleur varie du bleu au rouge selon la densité cellulaire. Le bleu

---

<sup>3</sup> IRB : Institut de Recherche en Biothérapie (CHU Montpellier)

représente une seule cellule, et plus le nombre de cellules augmente plus la couleur tend vers le rouge. A titre d'exemple, dans le cas des cellules traitées avec  $R_{10}$  à 25  $\mu\text{M}$  dans le tampon Locke pendant 2 heures, la population cellulaire est divisée en trois sous-populations (**figure 25**). La population avec une faible fluorescence et une taille comprise entre 200 et 300 nm correspond aux cellules vivantes. Les cellules mortes sont représentées par les deux autres populations mais à deux stades différents. Lorsque la fluorescence de l'IP est élevée et la taille des cellules est inférieure à 200 nm, les cellules sont considérées comme mortes, alors que lorsqu'elle est proche de zéro et la taille est inférieure à 100 nm, les cellules sont totalement dégradées.



**Figure 25 : Cytotoxicité du rosmarinat de décyle ( $R_{10}$ ) à 25  $\mu\text{M}$  dans le tampon Locke après 2 heures d'incubation**

## 2.8 Activité antimicrobienne

Deux souches microbiennes ont été sélectionnées : *Escherichia coli* K12 (LTH4263) et *Staphylococcus carnosus*. Une colonie formant une unité est inoculée dans 12 mL de gélose nutritive puis est introduite dans une microplaque 96 puits. La croissance bactérienne est directement déterminée sur les microplaques en mesurant la densité optique à 632 nm par un lecteur de microplaque Multi-Mode Synergy HT de la société BioTek Instruments Inc. (Bad Friedrichshall, Germany).

L'acide rosmarinique et ses esters sont solubilisés dans le DMSO puis dilués au millième dans un tampon phosphate à pH 7,2. Après avoir ajouté 120  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne (approximativement  $1 \times 10^4$  colonies formant une unité (CFU)/mL) dans chaque puits, 120  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations de rosmarinates

d'alkyle (5 à 500  $\mu\text{M}$ ) sont additionnés. Les bactéries sont incubées à 32 °C, et la densité optique est mesurée à 0, 3, 6, 12, 18, 24, et 48 heures.

Puis pour déterminer les capacités antimicrobiennes des rosmarinales d'alkyle, chaque milieu de culture d'un puits estensemencé sur gélose nutritive dans une boîte de Pétri. Après 24 heures d'incubation à 32 °C, le nombre de colonies formant une unité est comptée. Les résultats sont la moyenne de trois essais en triplicat (n=3).

## 2.9 Analyse statistique

Les résultats sont la moyenne de trois essais indépendants (n=3). Les différences significatives entre les moyennes sont déterminées par l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA).

L'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur les capacités antioxydantes de l'acide rosmarinique est analysée à l'aide du test de Mann-Whitneys.

## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

De nos jours, il est admis que le stress oxydant est impliqué dans diverses maladies métaboliques et dans certains cancers. Un déséquilibre entre la production d'EROs et les défenses antioxydantes induit des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines et l'ADN, qui peuvent avoir d'importantes conséquences physiopathologiques (Aruoma, 1998; Olinski *et al.*, 2007; Roberts and Sindhu, 2009). La mitochondrie est l'une des principales sources d'EROs (Murphy, 2009). Cet organe dont l'activité est également la cible des EROs est impliqué dans de nombreuses régulations cellulaires telles que la production d'ATP et la régulation de la concentration intracellulaire du calcium. Il influence également de manière importante la prolifération et la différenciation cellulaire et joue un rôle clé dans les processus apoptotique (Seyer *et al.*, 2006 ; Gulbins *et al.*, 2003). Par conséquent, le développement d'antioxydants capables de cibler directement les EROs directement au niveau mitochondrial est une stratégie prometteuse pour limiter le stress oxydant (Fantin and Leder, 2006; Fulda *et al.*, 2010; Edeas, 2011) .

Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques (polyphénols) sont présents de façon ubiquitaire dans le règne végétal. Leurs capacités antioxydantes et chélatrices des métaux leur confèrent de nombreuses propriétés biologiques incluant des effets antibactériens, anti-inflammatoires, antiviraux, anti-tumoraux et cardiovasculaires (Aggarwal and Harikumar, 2009). Ces molécules ont donc un rôle préventif dans de nombreuses pathologies comme les maladies métaboliques ou les cancers (Berghe, 2012). Cependant, la polarité de ces molécules phénoliques (acides hydroxycinnamiques, acides hydroxybenzoïques), très hydrophile diminue leur aptitude à traverser les barrières biologiques et limite leur activité. Pour accroître leur pouvoir antioxydant dans des systèmes compartimentés (émulsions, cellules), une des stratégies est de modifier leur polarité par greffage covalent de chaînes aliphatiques. (Figueroa-Espinoza and Villeneuve, 2005).

Des résultats récents sur les chlorogénates d'alkyle en émulsion huile dans eau ou en culture cellulaire ont montré l'existence d'une relation non linéaire entre l'hydrophobie des molécules testées et leur activité antioxydante (Laguerre *et al.*, 2009). Cette dernière augmente jusqu'à une longueur de chaîne alkyle de douze atomes de carbone, puis diminue de manière marquée au-delà. Cette chute de l'activité antioxydante pour les chaînes greffées les plus longues est connue sous le nom d'effet «cut-off». Ainsi, la lipophilisation avec une longueur de chaîne alkyle

optimale est une stratégie susceptible d'améliorer les propriétés antioxydantes de l'acide chlorogénique.

Dans le cadre de ces travaux de thèse qui succèdent à ceux de Mickaël Laguerre (Laguerre, 2009, thèse), la stratégie que nous avons adoptée consiste à étudier l'activité antioxydante d'un autre acide phénolique et de ses dérivés lipophilisés : l'acide rosmarinique. Nous souhaitons tester sur cette molécule l'existence de l'effet «cut-off» en culture cellulaire (fibroblastes du derme humain), mais surtout mieux comprendre ce phénomène non linéaire. De nombreuses équipes se sont intéressées aux propriétés antioxydantes de l'acide rosmarinique. Des travaux ont montré qu'il était l'un des plus performants pour céder un hydrogène par rupture homolytique parmi toute une série d'acides phénoliques testés : acide rosmarinique > acide chlorogénique > acide caféique > acide férulique > acide coumarique (Soobrattee *et al.*, 2005). En effet, ses deux fonctions o-diphénols (catéchols) lui confèrent de bonnes propriétés antioxydantes. Il possède également un large spectre de possibilités d'interventions préventives ou thérapeutiques au niveau des maladies cardiovasculaires (Karthik *et al.*, 2011), du diabète (Tavafi *et al.*, 2011), de l'inflammation (Huang *et al.*, 2009) ou de la maladie d'Alzheimer (Hamaguchi *et al.*, 2009).

Afin d'évaluer l'influence de la lipophilisation de l'acide rosmarinique sur son activité antioxydante au niveau cellulaire, nous avons synthétisé une large gamme de dérivés lipophilisés de cet acide phénolique appelé aussi phénolipides. Une première série d'esters a été synthétisée par addition d'alcools gras de différentes longueurs de chaînes, tandis qu'une seconde série a été obtenue par estérification de diacylglycérols homogènes de longueurs de chaînes variables. Puis, dans le but de comprendre le mécanisme d'action des rosmarinates d'alkyle, nous avons étudié comment la longueur de chaîne greffée affectait le passage de la molécule lipophilisée à travers la membrane plasmique, sa localisation intracellulaire et ses propriétés physico-chimiques au sein du cytoplasme.

## Partie I : Synthèse des dérivés lipidiques de l'acide rosmarinique

La membrane plasmique est composée d'une bicouche phospholipidique perméable aux lipides mais imperméable aux molécules polaires telles que les antioxydants. Pour faciliter leur passage vers le milieu intracellulaire, l'une des stratégies a consisté à les véhiculer dans des liposomes constitués de phospholipides et de diacylglycérols (Maurer *et al.*, 2001; Suntres and Omri, 2006) ou dans des nanoparticules (Munin and Edwards-Lévy, 2011). A titre d'exemple, l'encapsulation de l'épigallocatechine gallate dans des nanoparticules composées de polysaccharides a été utilisée dans la prévention contre le cancer de la prostate (Rocha *et al.*, 2010). La mise au point d'un vecteur lipidique susceptible de leur permettre de traverser la membrane plasmique semblait donc importante. Dans ce but, greffer directement sur l'antioxydant une chaîne alkyle ou un diacylglycérol a été envisagé. La lipophilisation de l'acide chlorogénique (Laguerre *et al.*, 2011) et de l'hydroxytyrosol (Tofani *et al.*, 2010) a conduit à une amélioration de leurs capacités antioxydantes en milieu cellulaire. Ce procédé, appliqué à l'acide rosmarinique permettrait ainsi d'adresser directement la molécule active au sein de la cellule.

### 1 Synthèse de rosmarinates d'alkyle

Les esters de l'acide rosmarinique ont été synthétisés selon la technique mise au point par Lecomte *et al.* (Lecomte *et al.*, 2010). Cette synthèse ne sera donc rappelée que brièvement. L'estérification s'effectue par catalyse acide en milieu fondu (absence de solvant organique), en présence d'Amberlite IR 120 H (**figure 26**). L'eau générée au cours de la réaction est absorbée en continu sur un tamis moléculaire additionné au milieu réactionnel. Le taux de conversion pour les alcools gras à chaînes courtes et moyennes atteint 99% en 4 jours. Cependant, pour les alcools plus longs tels que l'hexadécanol ou l'octadécanol, la production des alkyles rosmarinates s'avère très lente, car l'acide rosmarinique est très peu soluble dans ces alcools gras. L'ajout de 10% de THF au milieu réactionnel a donc permis de

solubiliser les deux substrats et d'augmenter par conséquent la vitesse de réaction. Ainsi, le taux de conversion croît de 30% à 70% en 21 jours.

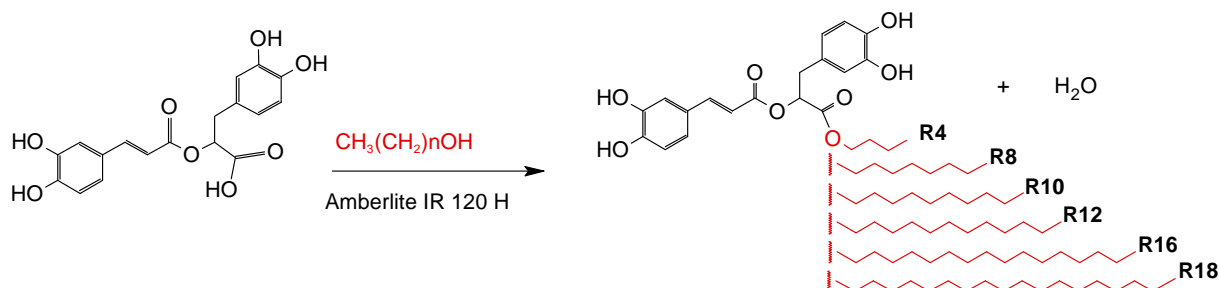


Figure 26 : Estérification de l'acide rosmarinique :  $\text{R}_4$  (rosmarinate de butyle),  $\text{R}_8$  (rosmarinate d'octyle),  $\text{R}_{10}$  (rosmarinate de décyle),  $\text{R}_{12}$  (rosmarinate de dodécyle),  $\text{R}_{16}$  (rosmarinate d'héxadécyle),  $\text{R}_{18}$  (rosmarinate d'octadécyle)

## 2 Synthèse de rosmarinates de diacylglycérol

Les rosmarinates de diacylglycérol ont été préparés selon la méthodologie multi-étapes décrite pour l'acide férulique par Reddy *et al.* (2010) (**figure 27**). L'acide rosmarinique est initialement estérifié sur un isopropylidène glycérol suivant la réaction de Mitsunobu. Puis, après déprotection du groupement isopropylidène dans le méthanol en présence d'une résine acide, deux alkyles identiques (de C4 à C18) sont alors estérifiées sur les deux fonctions hydroxyles déprotégées par catalyse enzymatique avec la lipase immobilisée de *Candida antarctica* B (Novozyme 435). Chaque étape de la synthèse est décrite ci-dessous.



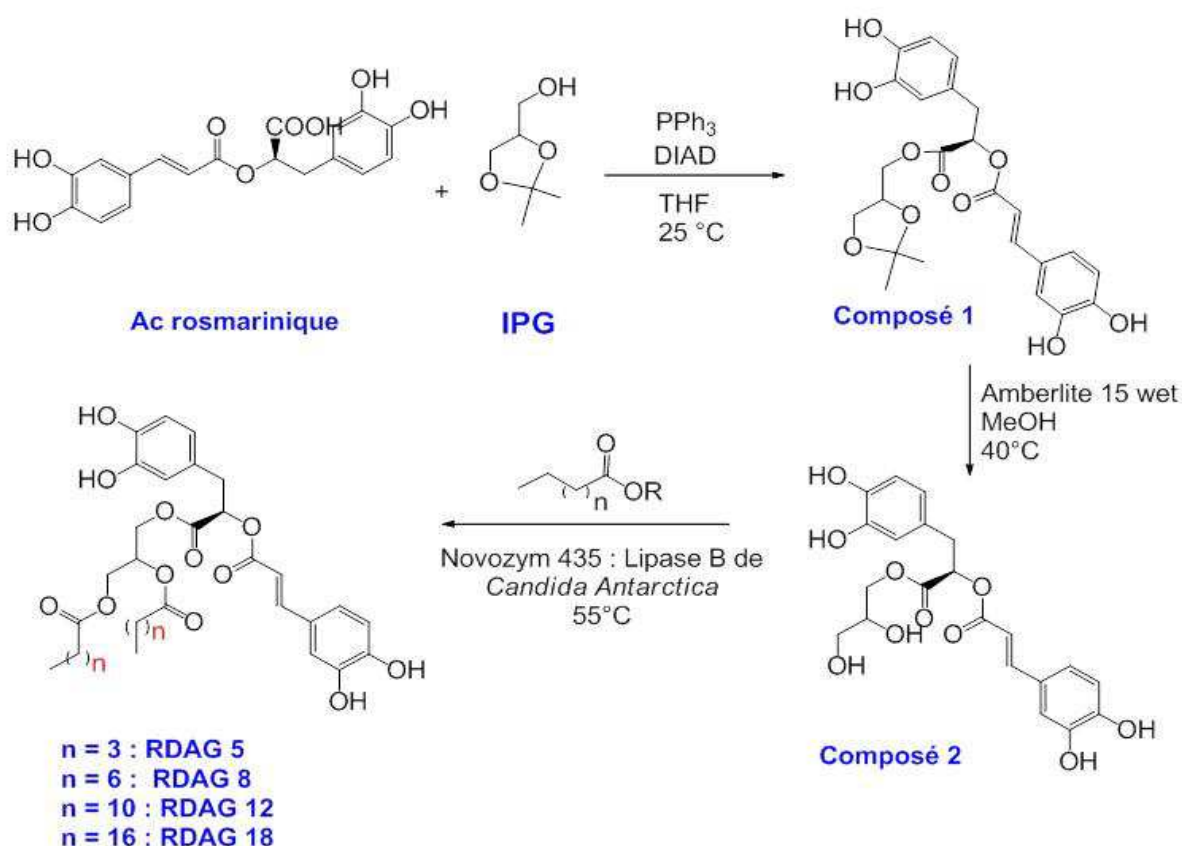


Figure 27 : Synthèse des rosmarinates de diacylglycérol. 1<sup>er</sup> étape : estérification de l'IPG par voie chimique sur l'acide rosmarinique, 2<sup>ème</sup> étape : déprotection du groupement acétal, 3<sup>ème</sup> étape : lipophilisation du rosmarinate de diacylglycérol

## 2.1 Estérification de Mitsunobu sur l'acide rosmarinique

La première étape de cette synthèse consiste à estérifier l'acide rosmarinique sur l'un des hydroxyles primaires du glycérol. L'isopropylidène glycérol (IPG) a été choisi car les hydroxyles en positions 1,2 sont protégés par une fonction cétal, permettant ainsi une estérification spécifique sur l'hydroxyle en position 3. La protection étant acido-labile, la réaction ne pourra pas être catalysée par un acide, comme elle l'a été pour les rosmarinates d'alkyles. La réaction de Mitsunobu est alors une alternative élégante aux réactions classiques d'estérification. Elle permet l'inversion de configuration des alcools, mais aussi la conversion d'alcools en esters grâce à la substitution nucléophile du dérivé déprotonable (acide rosmarinique) sur l'alcool (IPG) en présence de  $\text{PPh}_3$  (triphénylphosphonium) et de Diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (**figure 28**). Le  $\text{PPh}_3$  réagit avec le DIAD et génère un

intermédiaire : le P-N zwitterionique, généralement appelé « bétaine de Mitsunobu » qui est protonné en présence d'un nucléophile, ici l'acide carboxylique de l'acide rosmarinique. Un sel de phosphonium est alors formé qui active l'alcool (IPG) en transférant son groupement phosphore. Le sel d'oxyphosphonium ainsi produit réagit avec le nucléophile déprotoné pour conduire à la formation de l'ester désiré (rosmarinate d'isopropylidène glycérol), de l'oxyde de triphénylphosphine et de l'hydrazine réduite.

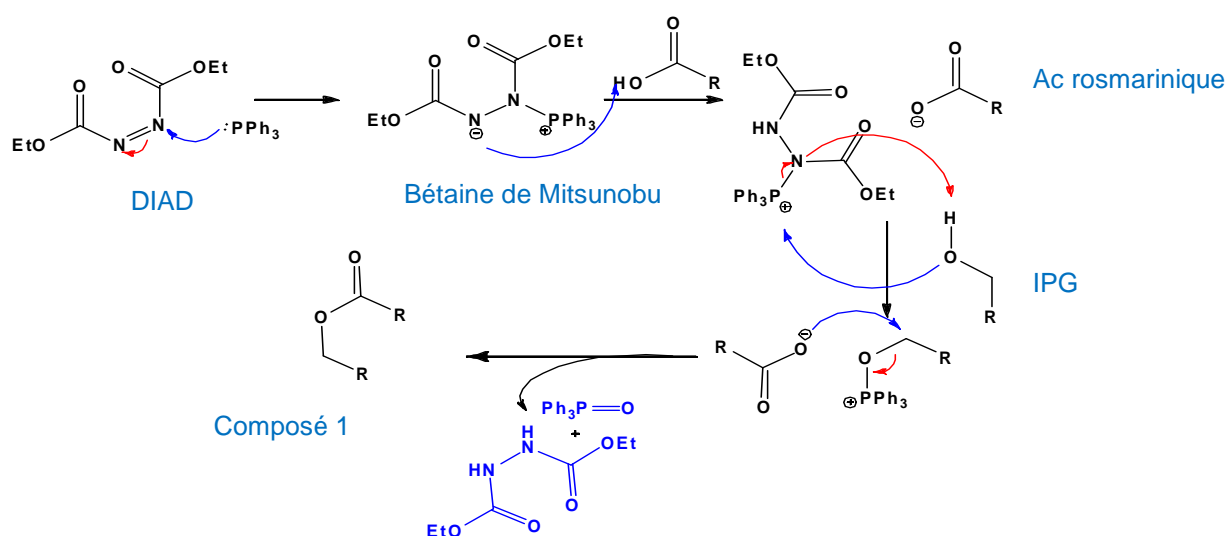
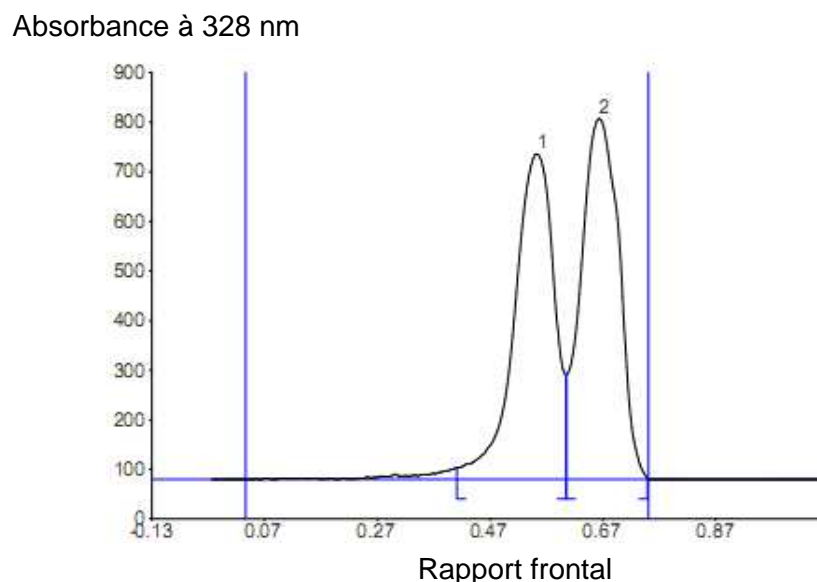


Figure 28: Mécanisme de l'estérification de l'acide rosmarinique par l'IPG via la réaction de Mitsunobu mettant en jeu le complexe DIAD- $\text{PPH}_3$

La cinétique de la synthèse du rosmarinate d'isopropylidène glycérol que nous nommerons « composé 1 » (**figure 27**), a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un densitomètre. Sur le chromatogramme montré sur la **figure 29**, deux composés apparaissent : l'acide rosmarinique avec un rapport frontal ( $R_f$ ) égal à 0,55 et un composé dont le  $R_f$  (0,66) correspond vraisemblablement au composé 1.



**Figure 29 : Suivi cinétique par densitométrie à 328 nm après 5 h de réaction. Le pic 1 correspond à l'acide rosmarinique ( $R_f = 0,55$ ) et le pic 2 au produit réactionnel ( $R_f = 0,66$ )**

Le suivi quantitatif de la réaction a été déterminé en fonction de l'aire sous chaque pic. Dès la première heure de réaction, un palier est atteint (**figure 30**). Le taux de conversion ne dépasse pas 50% après cinq heures de réaction. Un précipité est observé qui pourrait provenir de l'oxydation du  $PPh_3$  en oxyde de triphénylphosphine. Ce dernier ne pouvant réagir avec le DIAD, le complexe catalytique  $PPh_3$ -DIAD perdrait de son efficacité. Pour y remédier, l'ajout des catalyseurs ( $PPh_3$  et DIAD) au milieu réactionnel se fait en deux temps : 2,8 équivalents puis 0,5 équivalent après 5 heures de synthèse. Après 19 heures de réaction, le taux de conversion atteint 90%. Reddy *et al.* (2010) avaient obtenu un taux de conversion de 58% en 48 heures pour l'acide férulique. Ainsi, l'ajout dosé des catalyseurs semble être une stratégie encourageante pour la lipophilisation d'autres polyphénols.

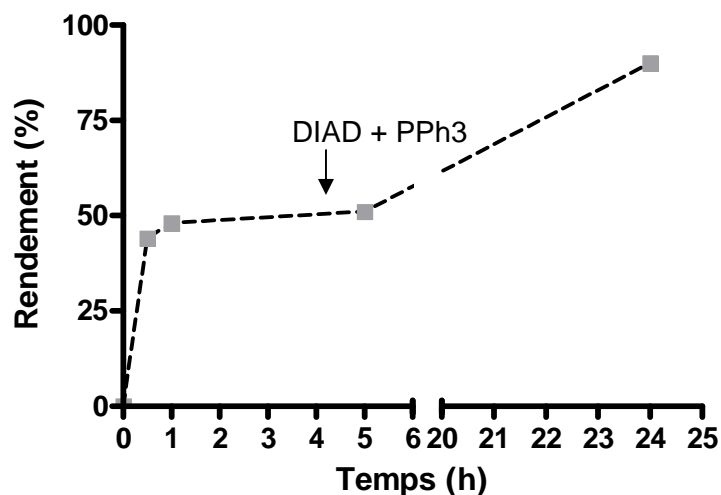


Figure 30 : Cinétique d'estérification de l'acide rosmarinique avec l'IPG via la réaction de Mitsunobu. L'avancement de la réaction est estimé via le rapport de l'aire sous les pics correspondants à l'acide rosmarinique et à son ester (figure 29)

## 2.2 Déprotection du groupement isopropylidène

La déprotection du groupement acétal est catalysée par l'Amberlite 15 wet (**figure 31**), résine composée de styrène-divinylbenzène dont le groupement sulfonique agit comme catalyseur acide. L'utilisation de l'Amberlite 15 wet a un double avantage : aucun produit secondaire n'est généré et son élimination est facile par filtration.

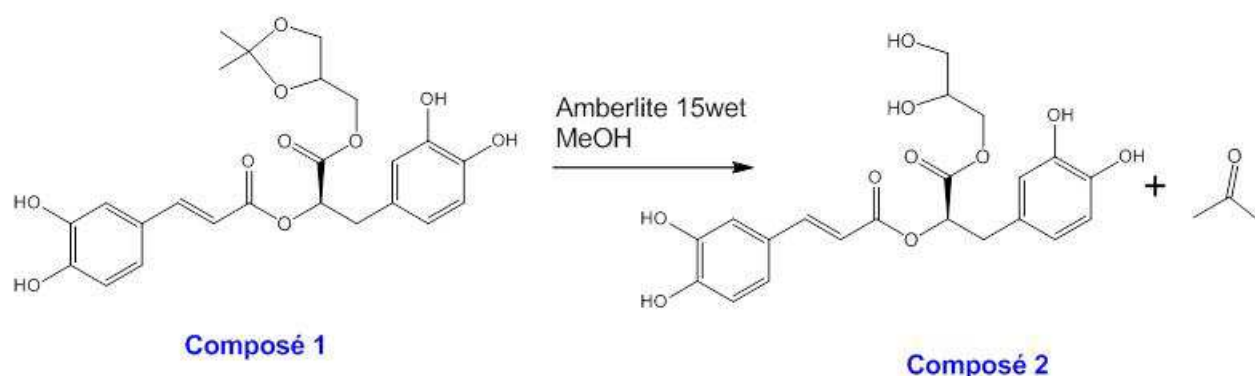
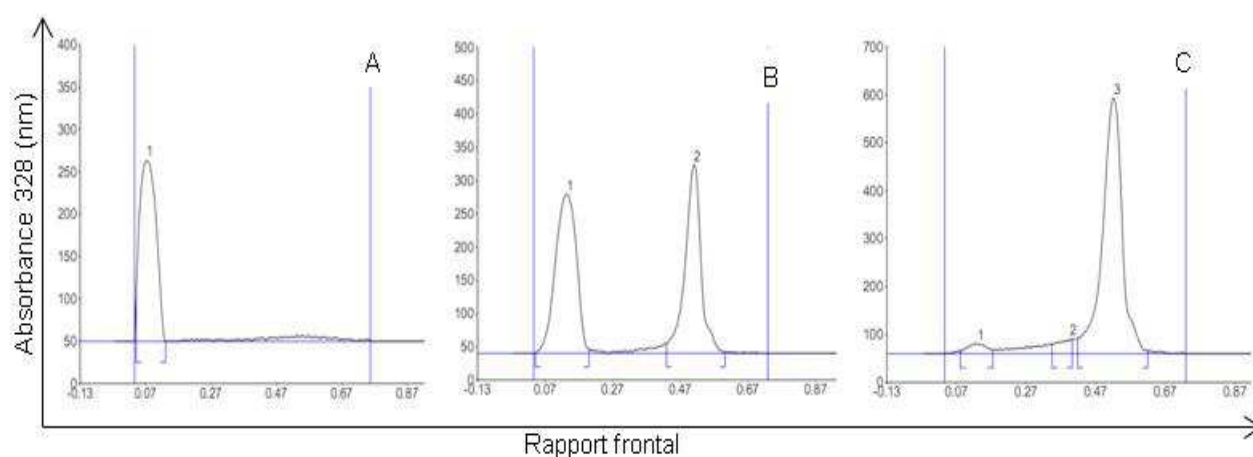


Figure 31 : Déprotection de l'IPG par catalyse acide avec l'amberlite 15 wet

La formation du rosmarinate de glycérol, suivie par CCM est analysée par densitométrie à 328 nm. La **figure 32A** montre l'apparition du composé 1 avec un Rf de 0,51 en début de réaction. La **figure 32B** est l'état d'avancement de la réaction après 6h30 de synthèse : la quantité du composé 1 a diminué de 54%, à l'inverse un produit réactionnel avec un Rf de 0,07 est détecté, qui pourrait être le composé 2. Après 23 heures de synthèse dans le méthanol, la réaction est totale (**figure 32C**). L'amberlite 15 wet est alors éliminée par filtration et le méthanol est évaporé sous pression réduite. La masse molaire de ce dernier est déterminée par spectrométrie de masse en injection directe par ionisation chimique à pression réduite en mode négatif (APCI<sup>-</sup>). L'ion moléculaire obtenu à 433 uma (unité de masse atomique) correspond à la forme déprotonée du composé 2  $[M-H]=433$  (**figure 33**).



**Figure 32 : Chromatogrammes des produits réactionnels de l'étape de déprotection de l'acétal du rosmarinate d'isopropylidène glycérol. A) réaction à T=0h : composé 1, B) réaction à 6 h 30 : composé 1 et composé 2, C) réaction à 23 h : composé 2**

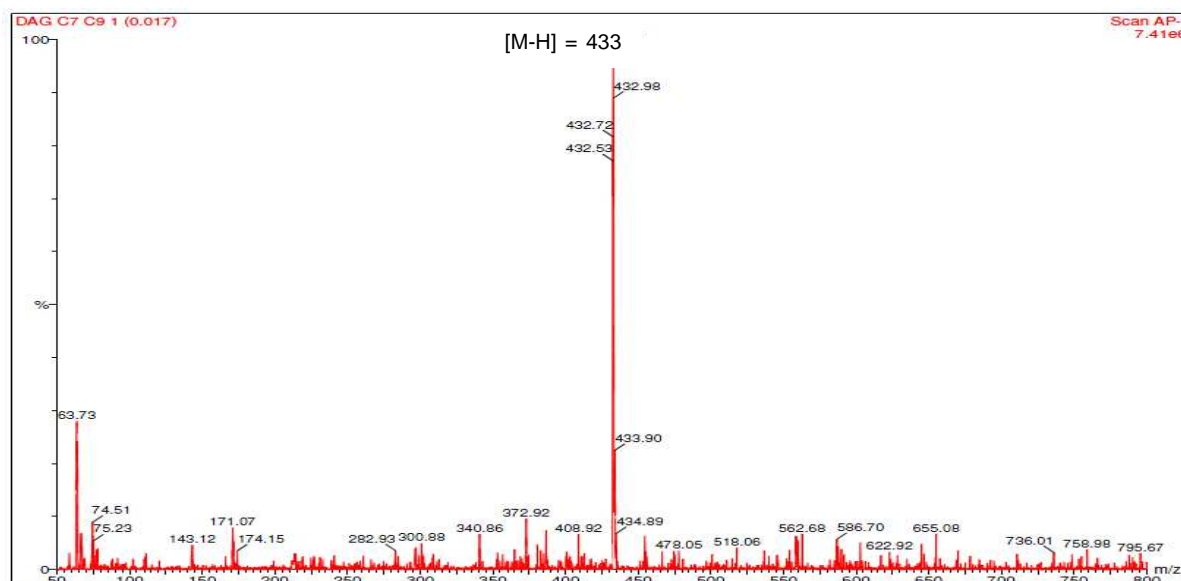


Figure 33 : Spectre de masse du glycérol rosmarinate  $[M-H]=433$  uma. La masse (m/z) en fonction de l'intensité relative du composé en mode APCI<sup>+</sup>

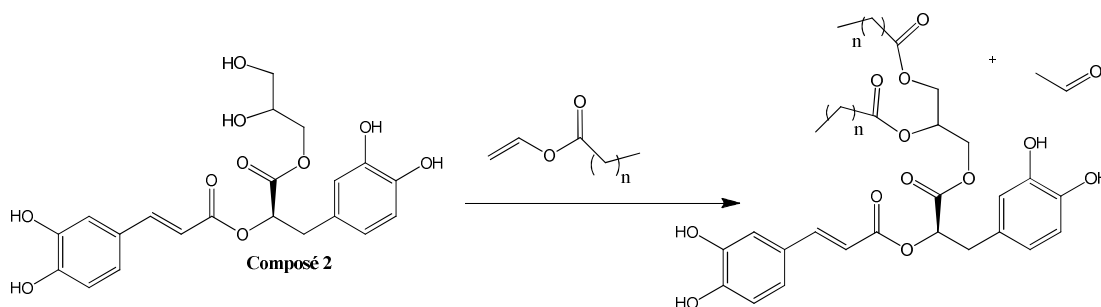
### 2.3 Estérification des positions 2 et 3 du rosmarinate de glycérol par la lipase B de *Candida antarctica*

La Lipase B immobilisée de *Candida antarctica* B (CALB) catalyse le transfert des alkyles sur les positions 2 et 3 du rosmarinate de glycérol. L'enzyme est immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse, commercialisée sous le nom de Novozyme 435. L'utilisation d'un support solide permet d'accroître la résistance thermique ou chimique de l'enzyme mais aussi de l'éliminer aisément et de faciliter ainsi l'étape de purification finale.

Les rendements des réactions de lipophilisation par voie enzymatique en milieu fondu (absence de solvant organique) sont souvent faibles, et les cinétiques obtenues sont particulièrement lentes lorsque la différence de polarité entre les deux substrats est élevée. L'ajout de solvant organique capable de solubiliser les deux substrats de polarité différente est l'un des moyens pour favoriser la réaction (Guyot *et al.*, 2000 ; Adachi and Kobayashi, 2005). Le choix du solvant est crucial, car s'il solubilise les deux substrats, il peut également modifier l'activité de l'enzyme. En effet, les solvants miscibles à l'eau tels que l'acétonitrile ou l'acétone peuvent altérer le microenvironnement aqueux de l'enzyme, c'est à dire l'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ). Ce paramètre est l'un des plus importants à contrôler en synthèse

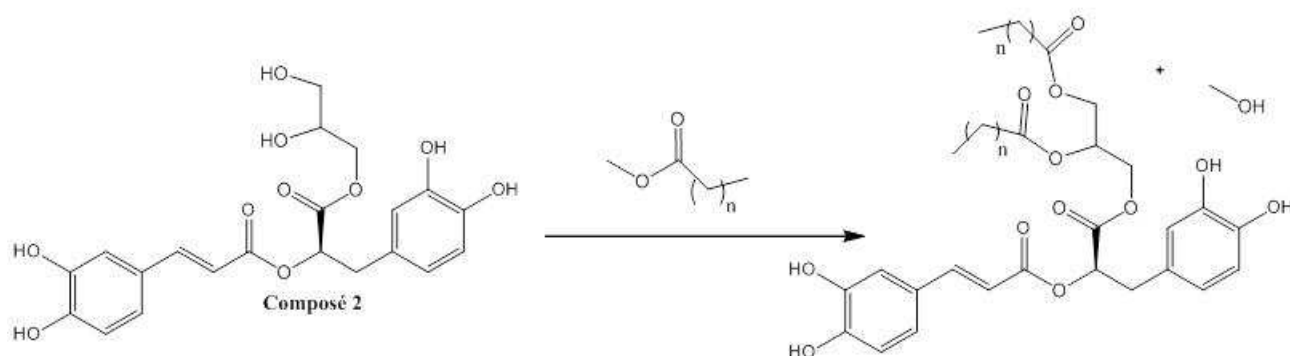
enzymatique car il détermine la quantité d'eau liée à l'enzyme, nécessaire à son activité (Villeneuve, 2007).

En fonction de la longueur de la chaîne alkyle que nous souhaitons greffer, deux types de donneurs d'acyles ont été sélectionnés pour estérifier le composé 2. Les esters de vinyles d'acides gras (vinyle laurate et stéarate) ont été choisis plutôt que les acides gras eux-mêmes ou leurs esters de méthyle. En effet, le produit libéré lors de la réaction, l'acétaldéhyde, très volatile est bien plus facile à éliminer que l'eau ou le méthanol. Ces substrats facilitent donc le déplacement de l'équilibre vers la formation des dérivés de DAGs. Le composé 2 est un composé polaire peu soluble dans les esters de vinyles. Par conséquent, un mélange hexane/butanone a été sélectionné pour solubiliser le milieu réactionnel. En huit jours de synthèse, la conversion en RDAG<sub>18</sub> est totale, celle en RDAG<sub>12</sub> est de 94% (**figure 34**). Cependant, après les étapes successives de purification par flash chromatographie aux étapes 1 et 3, les rendements finaux en RDAG<sub>18</sub> et RDAG<sub>12</sub> sont respectivement de 47% et de 34%.



**Figure 34 : Synthèse des 1 rosmarinoyl 2,3-dilauroyl glycérol et 1 rosmarinoyl 2,3-dioctadécanoyl glycérol**

Les acides pentanoïques et octanoïques sont greffés sur les fonctions hydroxyles du composé 2 via les esters méthyliques de ces acides (**figure 35**). Pour des raisons d'indisponibilité et de coût élevé, ces esters ont été préférés aux esters de vinyliques de ces mêmes acides pour la synthèse des 1-rosmarinoyl-2,3-dipentanoyl glycérol (RDAG<sub>5</sub>) et 1-rosmarinoyl-2,3-dioctanoyl glycérol (RDAG<sub>8</sub>).



**Figure 35 : Synthèse des 1 rosmarinoyl 2,3 dipentanoyl glycérol et 1 rosmarinoyl 2,3-dioctanoyl glycérol**

Lors de l'estérification, le méthanol libéré peut inactiver l'enzyme comme cela a été démontré avec la lipase CALB par Shimada *et al.* (2002). Les réactions sont donc effectuées à pression réduite à 40°C afin d'éliminer le méthanol formé au cours de la réaction. Pour favoriser l'interaction entre les deux substrats, ces derniers sont solubilisés dans un mélange toluène/butanone. Le taux de conversion de cette troisième étape est de 35% pour le RDAG<sub>5</sub> et 60% pour le RDAG<sub>8</sub> en dix jours.

Par la suite, certaines conditions pourront être optimisées pour cette étape. Ajuster la quantité d'enzyme ou modifier sa nature sont des paramètres à prendre en compte lors de l'estérification. Mais la difficulté majeure reste la différence de polarité des deux substrats. Leur solubilisation dans des liquides ioniques pourrait être une voie à privilégier en raison de leur non-volatilité, de leur stabilité thermique et de leur capacité à solubiliser une large gamme de molécules de polarités différentes (Katsoura *et al.*, 2009). En effet, Katsoura *et al.* (2006) ont synthétisé 51% de dérivés flavonoïdes avec le butyrate de vinyle en 48 heures dans un liquide ionique composé d'un dérivé cationique (1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate) et d'un composé anionique (hexafluorophosphate). La synthèse enzymatique de férulate de diacylglycérols a également été entreprise par Sun *et al.*, (2009) qui ont obtenu des rendements de réaction de l'ordre de 90%.

Lors des premières et dernières étapes, le milieu réactionnel est purifié par flash chromatographie pour éliminer les catalyseurs et les substrats n'ayant pas réagi totalement. Suite aux différentes étapes de purification, les rendements finaux sont



de 8% pour le RDAG<sub>5</sub> et de 30% pour le RDAG<sub>8</sub>. Ces étapes de purification dépendent de trois paramètres : la quantité de silice nécessaire lors du dépôt solide, le type de colonne utilisé et le gradient d'élution. Ce travail de synthèse n'étant pas déterminant pour ces travaux de thèse, les conditions optimales n'ont pas été recherchées.

## 2.4 Caractérisation des rosmarinates de diacylglycérol

Les produits purifiés sont identifiés par APCI en mode négatif. Les masses molaires déterminées correspondent aux formes déprotonées des DAG synthétisés. RDAG<sub>5</sub> a une masse molaire de 601,63, RDAG<sub>8</sub> de 685,34, RDAG<sub>12</sub> de 797,76 et RDAG<sub>18</sub> de 966,32 (tableau 6). Cette première caractérisation est en accord avec l'estérification des acides gras sur le rosmarinate de glycérol. De plus, l'intensité relative du signal est maximale, ce qui laisse supposer que les esters sont purs.

**Tableau 6 : ions obtenus par APCI (-) des rosmarinates de diacylglycérol**

Esters	RDAG <sub>5</sub>	RDAG <sub>8</sub>	RDAG <sub>12</sub>	RDAG <sub>18</sub>
Mode balayage	601,63 (100)	685,34 (100)	797,76 (100)	966,32 (100)

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intensité relative du signal

Les identifications structurales sont ensuite vérifiées par RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et 2D (HMBC). A titre d'exemple, la structure chimique du 1 rosmarinoyl 2,3-dioctadécanoyl glycérol et son identification structurale sont présentées **figure 36** et **tableau 7**.

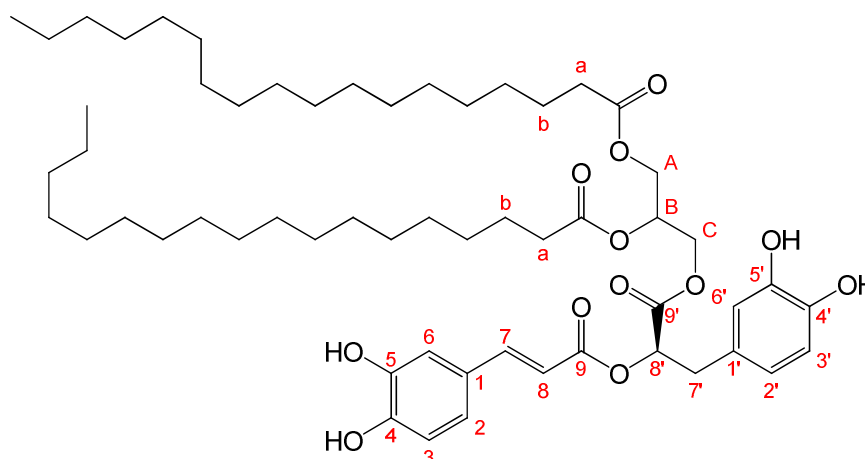


Figure 36 : Formule chimique du 1-rosmarinoyl-2,3-dioctadécanoyl glycérol (RDAG<sub>18</sub>)

 Tableau 7: RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du 1 rosmarinoyl 2,3 dioctadécanoyl glycérol (RDAG<sub>18</sub>)

Position	δ 13C (ppm)	δ 1H mult (J en Hz) (ppm)
1	127,08	
2	114,43	6,86 (dd, J=8,3Hz, J=1,6 Hz, 1H)
3	144,25	
4	147,25	
5	115,68	
6		6,94 (d, J=1,6 Hz, 1H)
7	146,85	7,48 (d, J=15,9 Hz, 1H)
8		6,15 ppm : (d, J=15,9 Hz, 1H)
9	167,02	
8'	73,10	5,30-5,21 ppm : (m, 1H, H8')
7'	36,90	
1'	127,96	
6'	116,61	
5'	143,49	
4'	143,06	
3'	121,97	6,61 ppm : (dd, J=8,1 Hz, 1H)
2'	115,51	
9'	170,07	
C	63,15	4,29 (dd, J=4,6 Hz, J=11,8Hz, 1H, HC)
B	69,00	5,21-5,10 (m, 1H, HB)
A	62,39	
CaA	174,19	
CaB	173,62	
HαA et B	34,30	
HβA et B	24,98	
CH <sub>2</sub> aliphatiques	32,07-29,27:	1,35-1,10 (m, 56H)
CH <sub>2</sub> aliphatiques	22,83:	
CH <sub>3</sub> aliphatiques	14,23:	0,85 (t, 6H)

Les spectres RMN  $^1\text{H}$ , montrent un déplacement chimique des protons aromatiques caractéristique de l'acide rosmarinique à 6,89 ppm. En effet, les groupements hydroxyles sur les cycles phénoliques sont des groupements donneurs d'électrons par conjugaison. Par conséquent, les hydrogènes en position ortho et para ( $\text{H}_2$ , 5, 6, 2', 5', 6') ont un déplacement chimique (entre 6,61 et 6,94 ppm) inférieur aux protons benzéniques (7,3 ppm). La présence des protons HA (dd, 4,3 ppm), HC (dd, 4,29 ppm) et HB (m, 5,21-5,10 ppm), déblindés par les oxygènes des groupements COOR, confirme celle des protons du glycérol. Les spectres du carbone indiquent les déplacements chimiques à 174,19 et à 173,62, caractéristiques de la fonction COOR des acides gras et celui à 167,01, particulier au carbone de la fonction COOR de l'acide rosmarinique. Les carbones spécifiques des chaînes aliphatiques sont situés entre 14 et 32 ppm suivant leur proximité avec la fonction COOR.

Les spectres de RMN 2D (HMBC) permettent d'établir les corrélations hétéronucléaires entre les noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . La corrélation C9'-HC indique la liaison entre le carbone 9' et le carbone C *via* l'oxygène : l'estérification du glycérol sur l'acide carboxylique de l'acide rosmarinique est donc confirmée. Les atomes de carbone ( $\text{C}=\text{O}$ ) des acides gras corrélerent soit avec les protons HA ( $\text{OCH}_2$ ) soit avec le proton HB ( $\text{OCH}$ ). Les acides gras sont donc correctement estérifiés sur les positions 1 et 2 du glycérol ce qui valide la structure des rosmarinates de diacylglycérols.

## 2.5 Conclusions

Deux séries d'esters d'acide rosmarinique ont donc été synthétisées. L'estérification de l'acide rosmarinique avec un alkyle à longue chaîne a été accélérée par l'ajout de THF, solubilisant ainsi l'acide rosmarinique dans l'octadecanol et l'hexadecanol, et favorisant les interactions entre l'enzyme et les substrats.

La stratégie multi-étapes utilisée a permis de synthétiser une série de rosmarinates de diacylglycérols, avec des taux de conversion pratiquement totaux

pour RDAG<sub>12</sub> et RDAG<sub>18</sub> (94 et 100%). Ces résultats ont été obtenus, d'une part, grâce à l'optimisation de la réaction de Mitsunobu par l'ajout des catalyseurs (PPh<sub>3</sub> et DIAD) en deux temps, et d'autre part, par la solubilisation des substrats dans un mélange hexane/butanone lors de l'estérification des esters de vinyles sur le rosmarinat de glycérol.

Pour les chaînes courtes, malgré la solubilisation du milieu réactionnel dans un mélange toluène/butanone, la catalyse conduit à de plus faibles rendements (35% de RDAG<sub>5</sub> et 60% de RDAG<sub>8</sub>). Pour optimiser cette synthèse biocatalysée de dérivés lipophilisés, plusieurs paramètres peuvent être réévalués comme l'origine et la quantité de biocatalyseur, ainsi que la nature du solvant. L'étape de purification mériterait elle aussi d'être étudiée afin d'accroître les rendements finaux.

En définitive, malgré des conditions opératoires qui n'ont pas été totalement optimisées, nous avons obtenu des quantités suffisantes de dérivés d'acide rosmarinique qui permettent d'évaluer l'influence du vecteur lipidique sur leur activité antioxydante en milieu cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés dans les parties suivantes

## **Partie II : Evaluation des propriétés antioxydantes des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique**

Les molécules antioxydantes suscitent actuellement un grand intérêt afin d'améliorer la conservation de produits alimentaires ou cosmétiques ou à des fins thérapeutiques. Ainsi, de nombreuses approches, qui ont fait l'objet de plusieurs revues, ont été utilisées afin de prédire l'activité antioxydante *in vitro* d'une molécule (Niki, 2010 ; Laguerre *et al.*, 2007).

Des méthodes dites non compétitives (absence de substrat oxydable), comme le test DPPH, permettent d'évaluer la capacité d'une molécule à céder un atome d'hydrogène ou un électron dans un milieu homogène (méthanol). Cependant, en fonction du milieu (émulsions, liposomes), l'activité antioxydante ne dépend pas seulement du potentiel redox des molécules mais également de leur localisation à l'interface (huile/eau, bicouche lipidique/eau). Ce phénomène est à l'origine du paradoxe polaire de Porter (1989). Dans ce contexte, les méthodes non compétitives ne sont pas représentatives du potentiel antioxydant des composés testés en émulsion. Par conséquent, des méthodes dites compétitives dans des systèmes émulsionnés ont été mises au point. Ces techniques consistent à mesurer la capacité d'une molécule à inhiber l'oxydation d'un substrat (lipide), oxydé chimiquement par un composé radicalaire tel que l'AAPH (2,2'-azobis [2-amidino-propane] dihydrochloride). Ainsi, le test des triènes conjugués autoxydables (CAT, conjugated autoxidizable triene), mis au point au laboratoire, est l'une des méthodes les plus directes qui évalue l'oxydation de l'huile de tung par spectrophotométrie dans une microémulsion (Laguerre *et al.*, 2008). Cette huile contient de très fortes proportions d'acide  $\alpha$ -éléostéarique ( $\approx 73\%$ ) qui porte trois doubles liaisons conjuguées (triènes conjugués) absorbant dans le domaine ultraviolet à 273 nm. Le milieu étant translucide, l'oxydation de ces triènes conjugués est traduite par une chute de l'absorbance directement suivie par spectrophotométrie. Le principal avantage de cette méthode chimique est de tester et de sélectionner rapidement un antioxydant (5 à 6 heures) et à haut débit (microplaque 96 puits).

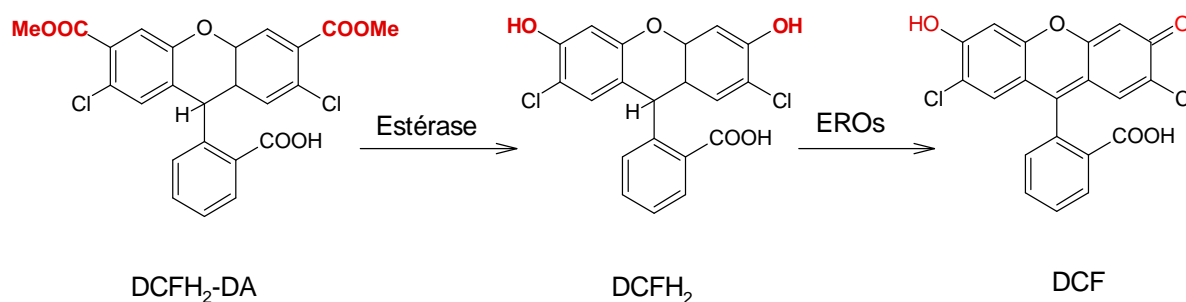
Cependant, comme toutes les méthodes *in vitro*, il est difficile par cette technique de prédire l'efficacité des molécules testées dans l'organisme. Ainsi, des expérimentations sur culture cellulaire ont été développées. Elles mettent en présence plusieurs substrats oxydables et plusieurs sources de radicaux libres. En effet, les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont les cibles de différentes EROs comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle. Dans des conditions physiologiques, le dosage des EROs est difficile car si leur réactivité est très élevée, leur concentration est très faible. L'oxydation est donc généralement induite par l'addition dans le milieu de culture d'agents oxydants tels que l'acide linoléique peroxydé, le 4-hydroxynonénal (Michiels and Remacle, 1991), l'AAPH ou les ions ferreux. Cependant, leur toxicité étant très forte, la mortalité cellulaire peut biaiser l'estimation du potentiel antioxydant d'une molécule. Dans ce contexte, l'UMR DMEM<sup>4</sup> a développé une technique où l'activité antioxydante des molécules est quantifiée sur des fibroblastes humains du derme génétiquement modifiés afin d'augmenter de manière importante la production d'EROs mitochondriaux (Grandemange *et al.*, 2005). Cette lignée cellulaire permet d'étudier spécifiquement l'activité protectrice des antioxydants dans le contexte d'un stress oxydatif d'origine mitochondriale. Dans ces cellules, en effet, le métabolisme mitochondrial et la production d'EROs sont stimulés par la surexpression du gène p43 qui code le récepteur mitochondrial de la triiodothyronine. Dans ces conditions, des quantités importantes d'anion superoxyde, précurseur des EROs cytoplasmiques, sont produites par le fonctionnement accru de la chaîne respiratoire. Ce modèle cellulaire évite donc d'initier un stress oxydatif avec un agent oxydant exogène.

La quantité d'EROs est mesurée par l'intermédiaire de sondes fluorescentes sensibles à l'oxydation. Plusieurs sondes sont commercialisées en fonction du site d'oxydation. Les EROs peuvent être détectées sur la membrane plasmique par la sonde C11-BODIPY, dans les mitochondries par le MitoSox Red et dans le cytoplasme par la diacétate 2',7'-dichlorofluoréscine (DCFH<sub>2</sub>-DA). Pour notre part, nous avons choisi de mesurer la concentration d'EROs à l'aide de la sonde DCFH<sub>2</sub>-DA. Cette dernière est hydrolysée par les estérases en 2',7'-dichlorofluoréscine

---

<sup>4</sup> DMEM : Dynamique Musculaire Et Métabolisme

(DCFH<sub>2</sub>) puis oxydée par les EROs en dichlorofluoréscine (DCF) qui est fluorescente ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 485 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  : 530 nm) (**figure 37**). Cette sonde est oxydée par toutes les espèces de radicaux libres (Gomes *et al.*, 2005). Ainsi, quel que soit le mécanisme d'action, les capacités antioxydantes des composés lipophilisés testés sont directement corrélées à leur aptitude à inhiber l'oxydation de la DCFH<sub>2</sub> en piégeant les EROs.



**Figure 37 : Hydrolyse de la DCFH<sub>2</sub>-DA par les estérases, puis oxydation de la DCFH<sub>2</sub> en DCF fluorescent ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 485 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  : 530 nm)**

## 1 Etude de l'activité antioxydante des rosmarinales d'alkyle

Les propriétés antioxydantes des rosmarinales d'alkyle ont déjà été analysées dans deux types d'émulsions huile dans eau. Un effet non linéaire dépendant de la longueur de la chaîne alkyle a été mis en évidence dans une microémulsion huile de tung/eau. L'activité antioxydante maximale est observée avec l'ester à 12 atomes de carbone (Laguerre *et al.*, 2010). Panya *et al.* (2012) ont observé un phénomène similaire dans une émulsion huile de soja/eau. Le rosmarinat de dodécyle (R<sub>12</sub>) inhibe le plus efficacement la peroxydation lipidique. Pour les auteurs, la longueur de la chaîne alkyle influence l'organisation des phénolipides dans l'émulsion. Ainsi, R<sub>12</sub> localisé à l'interface huile/eau est capable de piéger directement les radicaux libres. *A contrario*, l'acide rosmarinique non lipophilisé (R), soluble dans la phase aqueuse, mais aussi les rosmarinales d'hexadécyle (R<sub>16</sub>), d'octadécyle (R<sub>18</sub>) et d'eicosyle (R<sub>20</sub>), localisés dans les gouttelettes lipidiques ou organisés sous forme micellaire dans la phase aqueuse semblent être moins efficaces. Par conséquent, piéger les radicaux libres au lieu de l'oxydation semble être plus adéquat que de les neutraliser dans la phase aqueuse.

Par la suite, il a été intéressant d'estimer l'activité antioxydante des rosmarinales d'alkyle au niveau cellulaire. Dans le modèle cellulaire que nous avons utilisé (fibroblastes du derme humain modifiés), la source de radicaux libres est intracellulaire contrairement aux systèmes émulsionnés ou aux liposomes. Ainsi, le franchissement de la membrane plasmique est l'un des paramètres cruciaux qui régit l'activité antioxydante de la molécule testée.

La quantité d'EROs est mesurée avec la sonde DCFH<sub>2</sub> puis normalisée par la quantité d'ADN afin de tenir compte d'éventuelles modifications du nombre de cellules. Les cellules sont traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de rosmarinales d'alkyle (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu$ M) (**figure 38**). Pour tous les esters d'alkyle, nous montrons que l'effet antioxydant est dépendant de la dose utilisée. En effet, plus la concentration en rosmarinate d'alkyle augmente plus la quantité d'EROs intracellulaire diminue. Cependant, un palier est atteint au-delà d'une concentration de 25  $\mu$ M pour l'acide rosmarinique (R) et le butyle rosmarinate (R<sub>4</sub>).

A une concentration de 0,5  $\mu$ M, les rosmarinales d'octyle (R<sub>8</sub>) et de décyle (R<sub>10</sub>) se distinguent des autres esters. Ils induisent en effet une diminution de 33% (\*\*p<0,001) de la production d'EROs, alors que leurs homologues n'exercent aucune activité antioxydante significative (p>0,05)

Pour une concentration égale ou supérieure à 10 $\mu$ M, la quantité d'EROs décroît pour l'ensemble des rosmarinales d'alkyle. Cependant, cette réduction est dépendante de la longueur de la chaîne alkyle, et peut être classée en trois groupes : R-R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub>-R<sub>10</sub>, R<sub>12</sub>-R<sub>16</sub>-R<sub>18</sub>. En effet, à la concentration de 50  $\mu$ M, la quantité d'EROs intracellulaires des cellules traitées avec R et R<sub>4</sub> est respectivement de 58% et 65%, ces chiffres étant significativement supérieurs à ceux de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> (20 et 13%, \*\*\*p<0,001) et à ceux de R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> (42 et 43%, \*p<0,05).



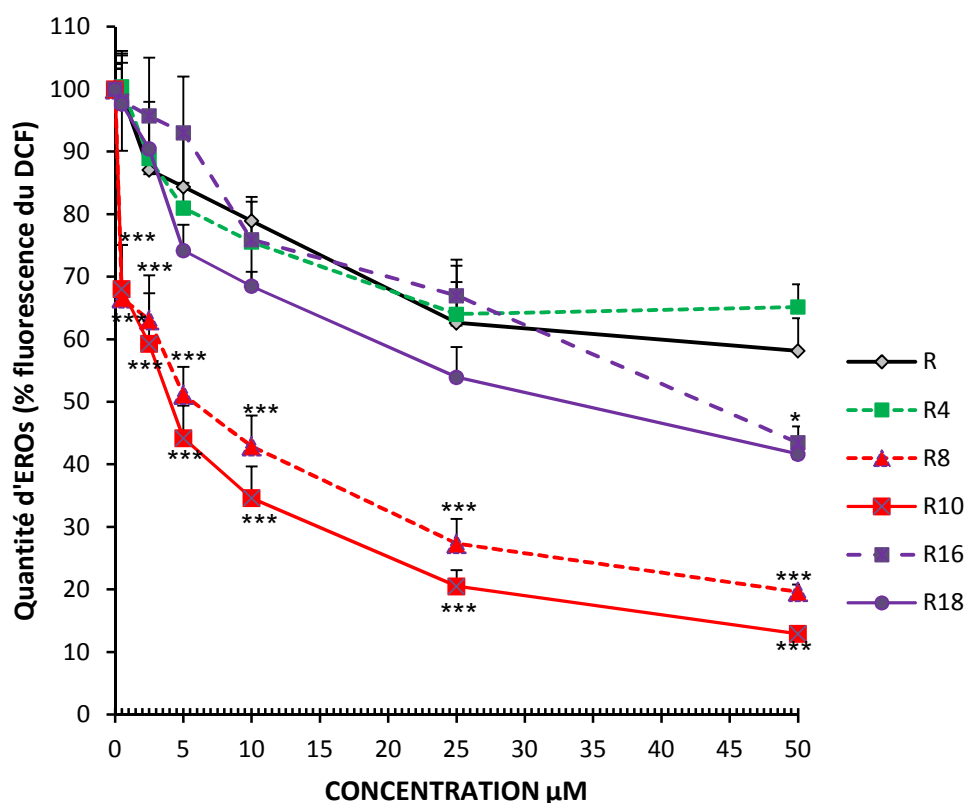
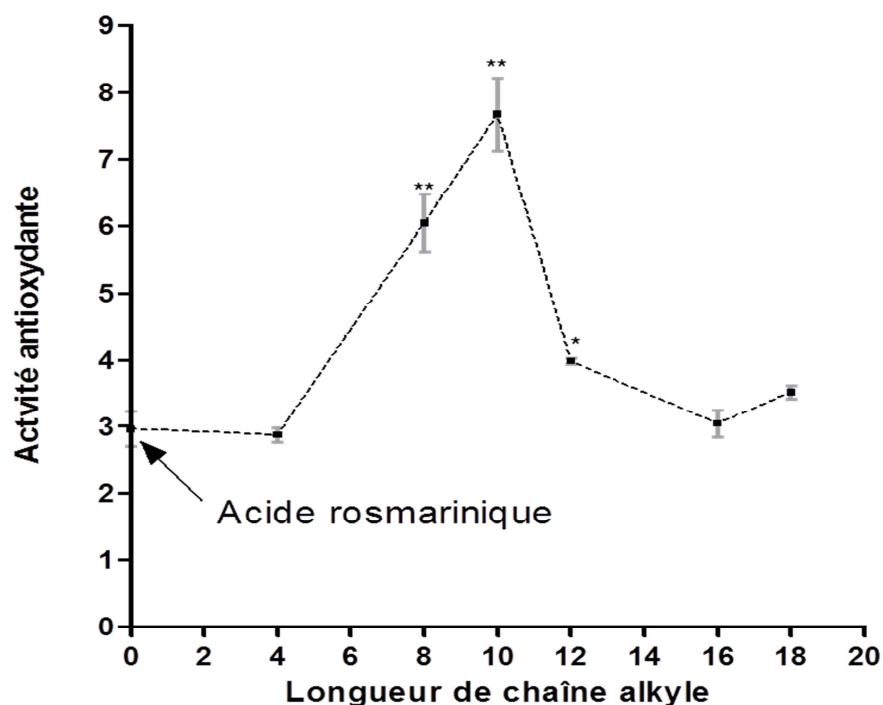


Figure 38: Influence de l'acide rosmarinique et de ses esters en fonction de la concentration utilisée (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 µM) après 24 heures de traitement. La quantité d'EROs est exprimée en pourcentage de la fluorescence initiale de la sonde DCF normalisée par rapport à la quantité d'ADN. \*p<0,05 et \*\*\*p<0,001 par rapport à l'acide rosmarinique. ANOVA, n=3

Pour une meilleure représentation de l'activité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne alkyle, l'aire sous la courbe est calculée à l'aide du modèle mathématique ( $y = a - [(a-d) \cdot x^c] / (b^c + x^c)$ ) avec le logiciel curve expert (**figure 39**). L'activité antioxydante augmente jusqu'à une longueur de chaîne de 10 atomes de carbone, puis diminue au-delà. Cet effet «cut-off» est similaire à celui observé avec les chlorogénates d'alkyles pour lesquels l'activité antioxydante maximale avait été observée pour le chlorogénate de dodécyle (notons cependant que le chlorogénate de décyle n'avait pas été testé) (Laguerre *et al.*, 2011). Ce phénomène non linéaire, également observé pour les dérivés alkyles d'hydroxytyrosol (Tofani *et al.*, 2010; Bernini *et al.*, 2012), a été rapporté pour d'autres activités. Ainsi, Park & Cho (2010) qui ont mesuré l'activité antimicrobienne des dérivés de catéchine ont observé une

efficacité maximale pour le catéchinéate de décyle. De même, Salem *et al.* (2010) ont montré que l'inhibition de la prolifération des cellules caco-2 du colon humain par l'isoquercetine estérifiée était optimale pour des chaînes alkyles de 6 à 12 atomes de carbone. Selon ces auteurs, la lipophilisation influencerait l'affinité de ces molécules pour la membrane. Cependant, le mécanisme d'action impliqué dans cet effet «cut-off» demeure incompris.



**Figure 39 : Activité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne des rosmarinates d'alkyle (l'activité antioxydante correspond à l'aire sous la courbe de chaque rosmarinate d'alkyle (figure 38) après 24 heures de traitement), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (test Mann-Whitney)**

L'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur les capacités de ces phénolipides à neutraliser les EROs pourrait s'expliquer par la lipophilie de la molécule déterminée par le logP. Cette propriété est utilisée pour anticiper les capacités de franchissement de membranaire d'une molécule. En effet, L'équipe de Lipinski (1997) a élaboré « la règle des 5 » qui prédit la solubilité et la perméabilité d'une molécule. Selon cette règle, les composés avec un logP supérieur à cinq traversent difficilement les membranes. Dans notre cas, la lipophilisation de l'acide

rosmarinique engendre une augmentation de l'hydrophobie. Cette modification structurale pourrait conférer à la molécule des propriétés différentes de diffusion à travers la membrane. Les valeurs de logP des rosmarinate d'alkyle ont donc été calculées *in silico* par le logiciel ACD lab (**tableau 8**).

**Tableau 8 : LogP théorique des rosmarinate d'alkyle calculé via le logiciel ACD lab**

Rosmarinate d'alkyle	LogP théorique
Acide rosmarinique	1,6
Rosmarinate de butyle	3,4
Rosmarinate d'octyle	5,4
Rosmarinate de décyle	6,4
Rosmarinate de dodécyle	7,4
Rosmarinate d'hexadécyle	9,5
Rosmarinate d'octadécyle	10,5

Bien que les valeurs de logP ont été déterminées de façon théorique, il apparaît que les valeurs obtenues sont cohérents avec cette théorie, mais sur la base d'un logP optimal supérieur. En effet, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> qui possèdent les propriétés antioxydantes les plus élevées ont des logP respectivement de 5,4 et 6,4, alors que les phénolipides qui ont un logP supérieur sont moins efficaces.

Ainsi, une première hypothèse expliquant l'influence de la lipophilisation pourrait être le transport de l'antioxydant à travers la membrane. En effet, le potentiel antioxydant de R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> pourrait être influencé par leur caractère hydrophobe, diminuant ainsi leur transport à travers la membrane. Malgré cela, leur activité est supérieure à celle de l'acide rosmarinique pour une concentration supérieure à 10 µM.

A l'inverse, R dont la valeur de logP est inférieure à cinq, est le moins performant, contrairement à la règle des 5. Cependant, à pH 7,2, R est chargé négativement (pKa (COOH) ≈ 4- 5), la membrane plasmique ayant une charge globale négative, la répulsion de charge ainsi créée pourrait limiter sa diffusion dans la cellule. De plus, Fadel *et al.* ont montré que l'acide rosmarinique était lié au

groupement polaire des phospholipides des liposomes. Sa localisation à l'extérieur des liposomes freinerait ainsi sa diffusion à travers la membrane (Fadel *et al.*, 2011).

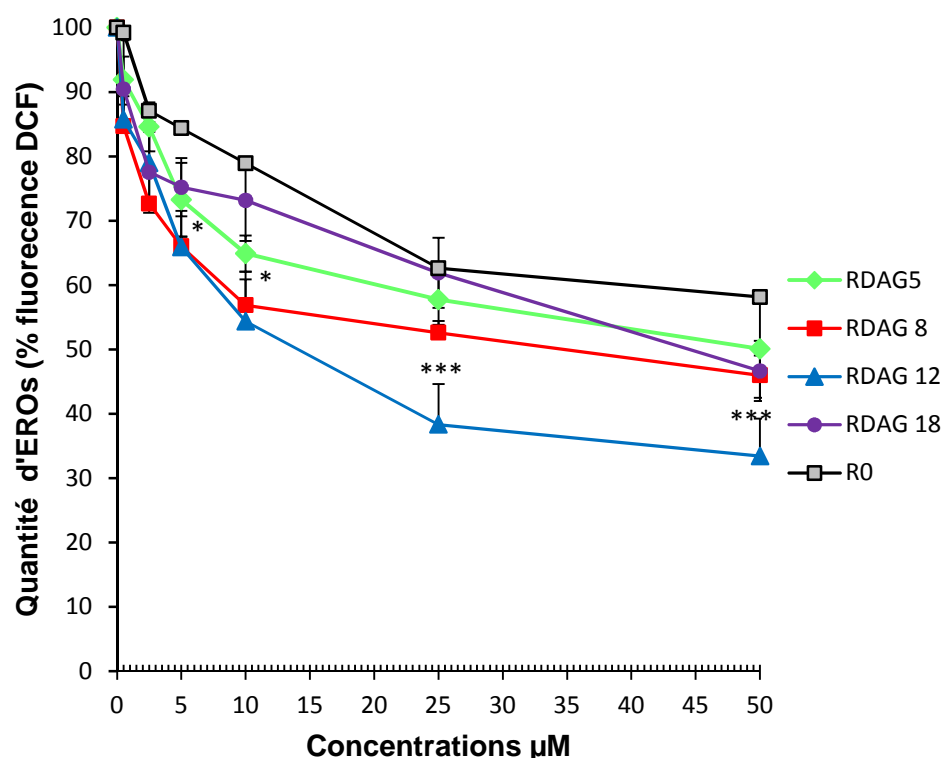
L'activité antioxydante de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> peut résulter de différents facteurs. D'une part, leur lipophilie pourrait être optimale, ce qui leur permettrait de traverser la membrane plasmique avec une grande efficacité. D'autre part, leur localisation intracellulaire pourrait différer par rapport à celle des autres esters de l'acide rosmarinique. En particulier, une lipophilie optimale pourrait permettre à R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> de traverser la double membrane mitochondriale, et de cibler ainsi directement le site majeur de production des EROs. Cette seconde hypothèse est particulièrement intéressante dans la mesure où la mitochondrie est à la fois un lieu de production et une cible des EROs, dont l'élévation dans l'organite est susceptible d'engendrer des dysfonctionnements mitochondriaux importants (Nicholls, 2002). Cette hypothèse a fait l'objet de travaux spécifiques décrits ultérieurement dans ce mémoire.

## 2 Activité antioxydante des rosmarinates de diacylglycérol

Les travaux décrits précédemment ont montré que l'estérification de l'acide rosmarinique par des alcools gras de différentes longueurs de chaînes alkyles modifie son activité antioxydante. Pour élargir l'étude de la lipophilisation, nous avons également synthétisé des dérivés lipophilisés de l'acide rosmarinique où cette fois-ci la chaîne aliphatique ne correspond plus à un alcool gras mais à un diacylglycérol (DAG). Cette stratégie a été mise en place auparavant pour véhiculer l'acide férulique (Laszlo *et al.*, 2010) et l'acide lipoïque dans des liposomes (Laszlo *et al.*, 2012). Ainsi, l'estérification de l'acide férulique et de l'acide lipoïque par un dioléoylglycérol a conduit à la synthèse de feruloyl dioleoylglycérol et de dihydrolipoyl dioléoylglycérol. L'incorporation de ces dérivés dans la bicouche lipidique des liposomes a engendré une meilleure protection de ces derniers contre la peroxydation. Ces composés lipophilisés, grâce à leur orientation vers la phase aqueuse, peuvent piéger les radicaux libres à l'interface. Dans notre cas, nous avons envisagé qu'un vecteur lipidique de type DAG pouvait améliorer le transport de l'acide rosmarinique à travers la membrane.

Les propriétés antioxydantes des rosmarinates de DAG ont été testées à différentes concentrations (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu$ M) pendant 24h (**figure 40**).

Comme pour les esters d'alkyle, nous observons que cette série d'esters d'acide rosmarinique exerce une activité antioxydante dose-dépendante.



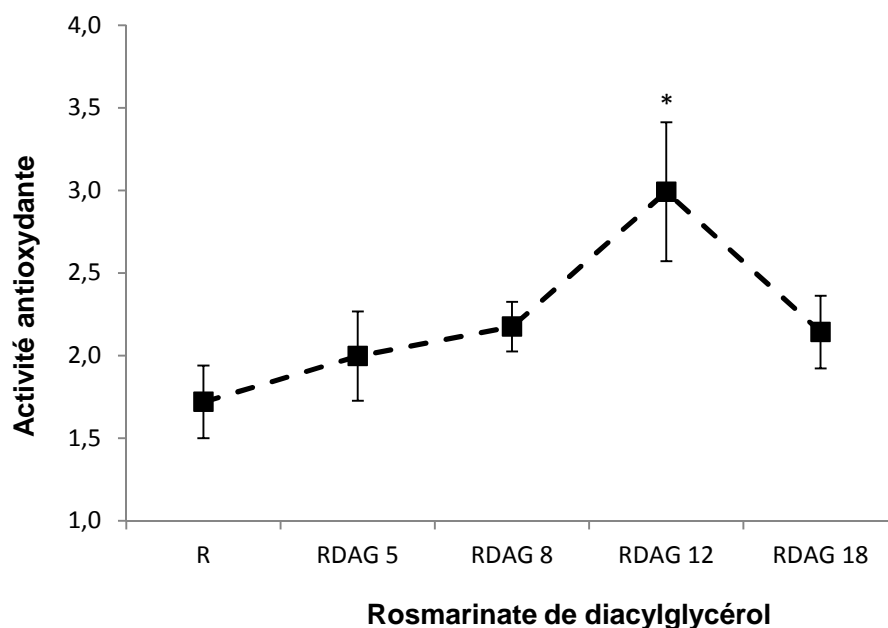
**Figure 40 :** Influence de l'acide rosmarinique et de ses esters de diacylglycérol sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu\text{M}$ ) après 24 heures de traitement. La quantité d'EROs est exprimée en pourcentage de fluorescence de la sonde DCF normalisée à la quantité d'ADN. \* $p < 0,05$  et \*\*\* $p < 0,001$  par rapport à l'acide rosmarinique. ANOVA,  $n=3$

A une concentration de 0,5  $\mu\text{M}$ , aucune activité antioxydante n'est observée pour l'acide rosmarinique et ses esters sauf pour RDAG<sub>8</sub> et RDAG<sub>12</sub> qui réduisent de 15% la quantité d'EROs intracellulaire (\* $p < 0,05$ ).

RDAG<sub>12</sub> est le dérivé lipophilisé le plus efficace (\*\*\* $p < 0,001$ ). A une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , il réduit la concentration d'EROs de 65% contre 40% pour l'acide rosmarinique. Les autres phénolipides sont également plus efficaces que R avec une diminution de la quantité d'EROs d'environ 50% (\* $p < 0,05$ ).

Comme nous l'avons fait pour les dérivés d'alkyles, l'aire sous la courbe de la **figure 40** est déterminée selon le même modèle mathématique afin d'obtenir une

meilleure représentation de l'impact de la lipophilisation sur l'activité antioxydante (**figure 41**). Nous observons ainsi que la capacité antioxydante des RDAGs augmente jusqu'à une longueur de chaîne alkyle maximale de 12 atomes de carbone. Le potentiel antioxydant du RDAG<sub>18</sub> est par ailleurs équivalent à celui de RDAG<sub>8</sub>. Ainsi, comme nous l'avons montré pour les rosmarinales d'alkyle, la lipophilisation modifie l'activité antioxydante des phénolipides.



**Figure 41: Activité antioxydante des rosmarinales de diacylglycérol en fonction de la longueur de la chaîne alkyle du DAG (l'activité antioxydante correspond à l'aire sous la courbe de chaque rosmarinate d'alkyle (figure 40) après 24 heures de traitement), \* $p < 0,05$  (test Mann-Whitney)**

Dans le cas des rosmarinales d'alkyle, R<sub>10</sub> dont le logP est de 6,44 démontrait la meilleure activité antioxydante alors que R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> dont le logP était respectivement de 9,46 et 10,51 avaient des capacités antioxydantes similaires à celle de l'acide rosmarinique (logP = 1,62). Si l'on ne tient compte que des valeurs de logP, il est surprenant de voir que RDAG<sub>12</sub>, dont le logP est de 9,66, proche de celui de R<sub>16</sub>, possède la meilleure activité antioxydante (**tableau 9**).

**Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques des rosmarinates de diacylglycérol**

Composé	Masse molaire (g/mol)	LogP théorique
Acide Rosmarinique	360,23	1,626
1 rosmarinoyl 2,3 dipentanoyl glycérol	602,63	5,223
1 rosmarinoyl 2,3 dioctanoyl glycérol	686,79	8,227
1 rosmarinoyl 2,3 dilauryol glycérol	799,00	9,667
1 rosmarinoyl 2,3 dioctadécanoyl glycérol	867,32	10,430

Ces résultats démontrent qu'au niveau cellulaire, le logP ne définit pas toujours l'activité antioxydante d'une molécule. En effet, l'activité antioxydante des rosmarinates de DAG, comme celle des rosmarinates d'alkyle, dépend fortement de la structure du vecteur lipidique et très peu de leur logP. Les deux chaînes alkyles des dérivés de DAG pourraient notamment augmenter l'affinité de l'antioxydant avec la membrane plasmique. Cependant, en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, les esters pourraient être localisés à la surface ou plus ancrés dans la membrane. L'oxydation de la membrane est initiée dans le milieu intracellulaire (milieu aqueux) puis propagée dans la membrane plasmique. Ainsi, la stabilité de la membrane est influencée par la structure des flavonoïdes (naringine, rutine) (Arora *et al.*, 2000). Ces molécules, de la même manière que le cholestérol, ont la capacité d'abaisser la fluidité membranaire, ceci limite la propagation de la peroxydation lipidique. La position de RDAG<sub>12</sub> dans la membrane plasmique pourrait donc être stabilisée par l'acide rosmarinique, inhibant ainsi les peroxydes.

Notre objectif étant d'évaluer l'influence du vecteur lipidique, seul RDAG<sub>12</sub> sera comparé au rosmarinate d'alkyle le plus antioxydant, c'est-à-dire R<sub>10</sub>.

### 3 Comparaison de l'activité antioxydante des esters d'acide rosmarinique avec la vitamine E et C

La vitamine E est constituée d'un ensemble de quatre composés phénoliques (tocophérols) qui comprend les formes  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$   $\delta$  tocophérols, dénommées ainsi en fonction de la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. L' $\alpha$ -tocophérol est le composé le plus actif. Cet antioxydant liposoluble s'ancre dans les membranes plasmiques ou dans les lipoprotéines (Atkinson *et al.*, 2010). La vitamine E a un rôle préventif dans les maladies cardiovasculaires en limitant l'oxydation des LDL (Pryor, 2000), notamment dans la prévention de l'athérosclérose en contrôlant la génération d'isoprostanes (Pratico *et al.*, 1998). Elle régule également les cascades de phosphorylations impliquées dans la prolifération cellulaire (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010). Cependant, comme pour la majorité des antioxydants, à de fortes concentrations, la vitamine E exerce une activité pro-oxydante pouvant appauvrir le milieu intracellulaire en glutathion, et par conséquent augmenter la quantité d'anions superoxydes (Pearson *et al.*, 2006; Rietjens *et al.*, 2002).

La vitamine C ou acide L-ascorbique est un antioxydant localisé dans le milieu intracellulaire. Elle piège les radicaux hydroxyles et peroxydes avant qu'ils n'induisent la peroxydation lipidique. A titre d'exemple, la vitamine C limite la peroxydation lipidique après une exposition des cellules aux rayons UV (Meves *et al.*, 2002). De plus, elle améliore l'activité antioxydante de la vitamine E en participant, avec le coenzyme Q, à la régénération de cette dernière. Aujourd'hui, la synergie entre la vitamine E et la vitamine C est une référence dans la protection des membranes plasmiques contre la peroxydation lipidique et dans la lutte contre le stress oxydant. Nous avons donc choisi de comparer l'efficacité de ces composés avec les dérivés lipophilisés possédant la meilleure activité antioxydante : le rosmarinate de décyle ( $R_{10}$ ) et le 1-rosmarinoyl-2,3-dilauroyl glycérol ( $RDAG_{12}$ ).

Comme précédemment, la quantité d'EROs a été déterminée avec la sonde DCFH<sub>2</sub>, et les cellules ont été traitées avec trois concentrations différentes 0,5, 5 et 25  $\mu$ M d'antioxydants pendant 24 heures (**figure 42**).



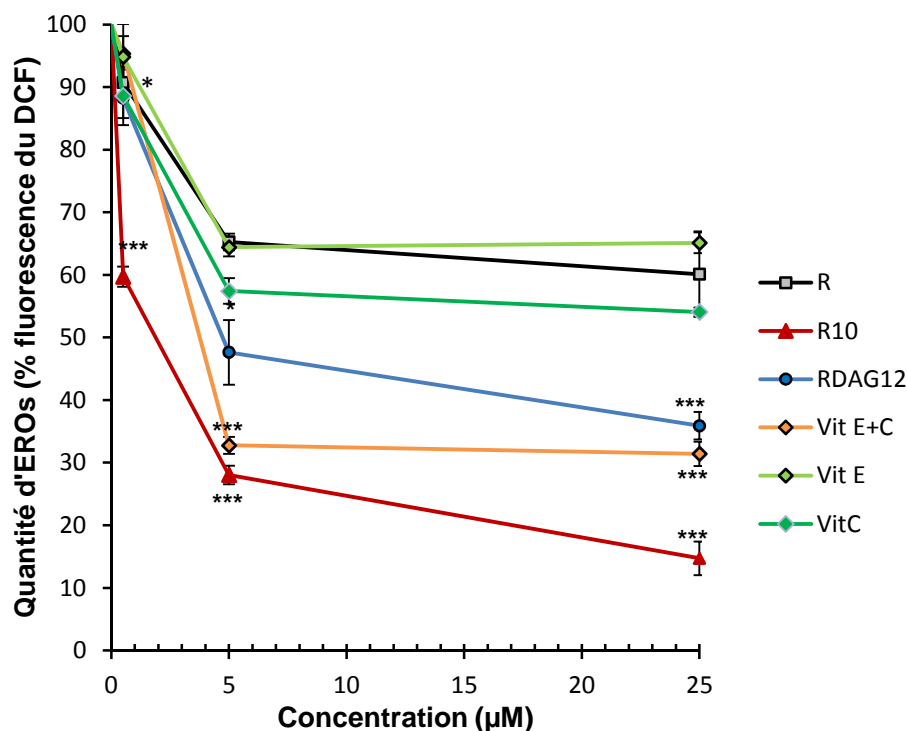


Figure 42 : Influence de R, R<sub>10</sub>, RDAG<sub>12</sub>, vitamine E, vitamine C et de leur association sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (0,5 ; 5 et 25 µM), exprimée en pourcentage de fluorescence de la sonde dichlorofluoréscine (DCF) normalisée à la quantité d'ADN, après 24 heures de traitement. Les résultats sont la moyenne de 3 mesures indépendantes. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 par rapport à l'acide rosmarinique, test ANOVA n=3

Nous confirmons que l'activité antioxydante des phénolipides augmente en fonction de la dose ; par ailleurs, celle de l'acide rosmarinique, des vitamines C et E ou des vitamines E + C est maximale dès la concentration de 5 µM. A 25 µM, la quantité d'EROs intracellulaires est diminuée respectivement de 35, 42 et 67% par un traitement à la vitamine C, à la vitamine E ou aux vitamines C+E. Quelle que soit la concentration, R<sub>10</sub> possède la meilleure activité antioxydante. En effet, dès la concentration la plus faible (0,5 µM), R<sub>10</sub> réduit de 40% (\*\*p<0,001) la quantité d'EROs contre 10% (\*p<0,05) pour les autres molécules testées. Dès 5 µM, ce rosmarinat d'alkyle possède la même activité que celle des vitamines E+C à la plus forte concentration testée (réduction d'environ 70% de la quantité d'EROs). Enfin, en présence de 25 µM de R<sub>10</sub>, la quantité d'EROs est diminuée de 80% (\*\*p<0,001).

L'activité antioxydante de la vitamine C est équivalente à celle de l'acide rosmarinique ( $p > 0,05$ ), et ces deux molécules présentent une activité maximale dès la concentration de 5  $\mu\text{M}$ . Ce dernier phénomène pourrait notamment s'expliquer par la dégradation de ces deux composés sous forme de quinone qui accentuerait leur effet pro-oxydant à forte concentration. Dans cette hypothèse, les résultats obtenus à partir de la concentration de 5  $\mu\text{M}$  pourraient provenir d'un équilibre entre l'effet antioxydant et pro-oxydant de ces molécules. Cette possibilité est également valable pour la vitamine E qui peut également exercer un effet pro-oxydant à forte concentration.

La lipophilie de la vitamine E ( $\log P = 9,95$ ) est équivalente à celle de RDAG<sub>12</sub> ( $\log P = 9,66$ ), et selon la littérature, la vitamine E est ancrée dans la membrane plasmique. Nous pouvons, par conséquent, émettre l'hypothèse que RDAG<sub>12</sub> l'est également. Cependant, les capacités antioxydantes de RDAG<sub>12</sub> sont supérieures à celle de la vitamine E. La structure chimique de l'acide rosmarinique composée de deux fonctions catéchols, serait capable de neutraliser plus de radicaux libres que la vitamine E. En théorie, la vitamine E céderait un atome d'hydrogène contre quatre pour l'acide rosmarinique.

L'ensemble de ces premiers résultats s'avère encourageant. En effet, ils montrent qu'une modulation de la lipophilie de l'acide rosmarinique modifie considérablement son activité antioxydante. La lipophilisation de ce polyphénol avec une seule chaîne alkyle semble constituer la stratégie la plus avantageuse pour diminuer la quantité d'EROs intracellulaires.

## 4 Conclusions

Notre étude utilise une lignée cellulaire produisant de manière spontanée des quantités élevées d'EROs. Nous pouvons conclure que le traitement par les rosmarinales d'alkyle est plus efficace que celui par les esters de diacylglycérol. En effet, la comparaison du meilleur antioxydant de chaque groupe montre qu'à la concentration de 0,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{R}_{10}$  réduit de 40% la quantité d'EROs intracellulaires, alors que cette diminution est de l'ordre de 15% pour la même concentration de  $\text{RDAG}_{12}$ . Cependant, le résultat le plus marquant est probablement la démonstration que  $\text{R}_{10}$  possède une activité antioxydante supérieure à celle des vitamines E et C, seules ou en synergie, considérées comme des molécules de référence. La lipophilisation de l'acide rosmarinique constitue donc une approche prometteuse afin de lutter contre les conséquences du stress oxydant.

Par la suite, la stratégie adoptée a été de poursuivre l'étude de la compréhension du mécanisme d'action des rosmarinales d'alkyle, ces derniers ayant montré la plus forte activité antiradicalaire lors des expérimentations décrites ci-dessus. Notre objectif a consisté à comprendre à quel niveau la longueur de la chaîne alkyle greffée sur l'acide rosmarinique pouvait interférer sur l'activité antioxydante de la molécule et induire l'effet «cut-off». Dans ce but, l'internalisation des molécules et leur localisation intracellulaire ont été étudiées en relation avec leur efficacité.

## Partie III : Etude du mécanisme d'action des rosmarinales d'alkyle sur culture cellulaire

L'activité antioxydante des polyphénols dépend de leur capacité à céder un hydrogène et à transférer un électron aux radicaux libres. Cette capacité est déterminée par leur BDE (Bond Dissociation Enthalpy) et par leur potentiel d'ionisation (PI). En effet, plus la valeur de BDE est faible, plus le transfert de l'hydrogène de la fonction hydroxyle vers le radical est facilité. De même, plus le PI est faible plus le transfert d'électron est aisé grâce à la délocalisation des électrons  $\pi$  sur le cycle phénolique de l'antioxydant (Leopoldini *et al.*, 2011). Un second mécanisme antioxydant découle des propriétés chélatrices des polyphénols. Leurs structures catéchols et gallols chélatent les ions  $\text{Fe}^{2+}$  évitant ainsi la génération de radicaux libres. En effet, ces métaux sont impliqués dans les réactions de Fenton qui provoque la dismutation du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle. Ce dernier, très réactif, produit des dommages irréversibles sur l'ADN pouvant être impliqués dans divers cancers (Battin *et al.*, 2006). En plus de leurs propriétés chimiques, les polyphénols peuvent également contrôler l'activité d'enzymes produisant des radicaux libres. Chang *et al.* (1993) ont ainsi montré que la quercétine est un inhibiteur de la xanthine oxydase. Cette faculté provient de sa structure plane qui lui permet d'interagir avec le site actif de l'enzyme provoquant son inhibition (Lin *et al.*, 2002). A ses propriétés antioxydantes s'ajoute un large spectre de propriétés biologiques incluant des effets antibactériens, anti-inflammatoires, anticancérigènes ainsi qu'une action dans la prévention de maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives (Middleton *et al.*, 2000). Cependant, en amont de son activité biologique, l'efficacité d'une molécule dépend de son absorption, de sa solubilisation, de sa localisation intracellulaire et de sa cytotoxicité. Nos travaux de thèse ont donc porté sur l'étude de ces derniers paramètres. Afin de comprendre le mode d'action des rosmarinales d'alkyle, plus particulièrement l'influence de la longueur de la chaîne alkyle, nous avons vérifié l'existence d'une corrélation entre la capacité antioxydante des phénolipides, leur internalisation dans la cellule et leur localisation intracellulaire. Leur solubilisation liée à leurs propriétés d'auto-agrégation a été déterminée par DLS (Dynamic Light Scattering). Enfin, la cytotoxicité de chaque ester a été estimée par cytométrie de flux.

## 1 Etude cinétique de la quantité d'EROs en fonction des rosmarinates d'alkyle

La première stratégie mise en place pour étudier l'impact de la lipophilisation de l'acide rosmarinique sur son activité antioxydante a consisté à suivre son influence à court terme (2 heures) sur la quantité intracellulaire des EROs en fonction de la longueur de la chaîne alkyle des esters. La quantité des EROs présente dans la cellule est déterminée comme précédemment par l'oxydation de la sonde DCFH<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 485 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  : 530 nm). L'influence de la longueur de la chaîne alkyle est observée toutes les cinq minutes, pendant deux heures, et deux milieux de culture ont été testés : le DMEM sans rouge de phénol (SRP) et le tampon Locke.

Le DMEM SRP est le milieu le plus proche du milieu de culture initial des fibroblastes du derme humain. Le tampon Locke est un milieu couramment utilisé en biologie cellulaire pour des analyses rapides (2 heures). Sa composition en glucose, sels de potassium, magnésium et en HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) permet de maintenir l'osmolarité du milieu et son pH à 7,2.

### 1.1 Etude cinétique pendant 2 heures de traitement dans le tampon Locke et le DMEM SRP

Dans le tampon Locke, trois concentrations ont été utilisées pour chaque rosmarinate d'alkyle. La **figure 43** représente l'évolution de la quantité intracellulaire d'EROs en fonction du temps pour chaque phénolipide étudié.

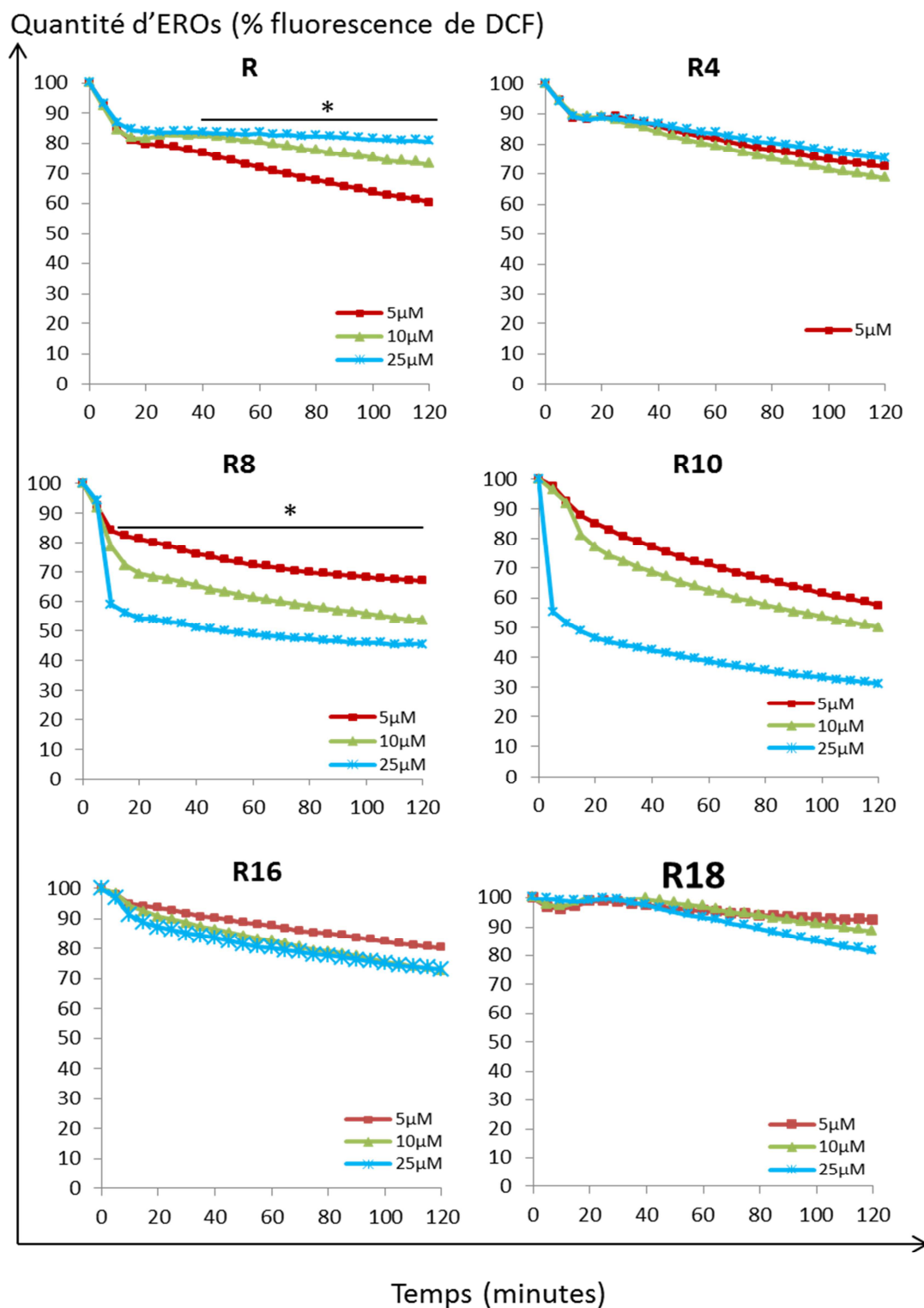


Figure 43 : Activité antioxydante des rosmarinates d'alkyle dans les cellules cultivées dans le tampon Locke pH=7.2 pendant deux heures à 5, 10, et 25  $\mu$ M. Le niveau d'EROs est exprimé en fonction du pourcentage de la fluorescence initiale de la DCF normalisée par rapport à la quantité d'ADN. \* $p < 0,05$ , ANOVA  $n=3$

Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment obtenus lors d'un traitement de 24 heures (Partie 2, paragraphe 1, **figure 38**). Après deux heures de traitement, l'activité antioxydante des esters les plus hydrophobes (le rosmarinate d'hexadécyle ( $R_{16}$ ) et le rosmarinate d'octadécyle ( $R_{18}$ ) est la plus faible, avec une réduction maximale de 27% de la quantité d'EROs. Le rosmarinate de butyle ( $R_4$ ) démontre une activité à peine plus élevée avec une réduction maximale de 30%. De plus, il n'existe pas d'effet dose-dépendant pour ces trois molécules. Paradoxalement, la plus faible concentration d'acide rosmarinique (R) induit la réduction la plus importante de la quantité d'EROs intracellulaires (40%) par rapport aux deux autres concentrations testées (25  $\mu$ M : 19% ; 10  $\mu$ M : 27%). Il semble donc que, dans ces conditions expérimentales, une augmentation de la dose d'acide rosmarinique engendre une diminution de son efficacité antioxydante, ce qui pourrait résulter de l'influence pro-oxydante de ce composé.

A nouveau,  $R_8$  et  $R_{10}$  possèdent l'activité antioxydante la plus élevée, avec une réduction respective de la quantité d'EROs de 55 et 70% à 25  $\mu$ M et après deux heures de traitement ; de plus, ces deux phénolipides démontrent une activité dose-dépendante ( $p < 0,05$  entre chaque concentration).

La même étude a été réalisée en utilisant le DMEM SRP au lieu du tampon Locke afin de cultiver les fibroblastes du derme humain (**figure 44**). Contrairement aux résultats précédents, R,  $R_4$ ,  $R_8$  et  $R_{10}$  ont les mêmes activités antioxydantes, avec une réduction de la quantité intracellulaire d'EROs d'environ 40%, quelle que soit la concentration utilisée ( $p < 0,05$ ). La longueur de la chaîne alkyle de ces esters n'influence donc pas l'activité à court terme de ces molécules. Par contre, en accord avec nos résultats précédents, nous montrons que l'activité antioxydante des esters à 16 et 18 atomes de carbone est très réduite (diminution de la quantité d'EROs : entre 5 et 10%). Lorsque les cellules sont cultivées dans ce milieu, l'influence des phénolipides est uniquement dépendante de la dose utilisée pour l'acide rosmarinique (à 60min : réduction de 20% d'EROs à 25  $\mu$ M et 40% à 5  $\mu$ M,  $p < 0,05$ ). Le comportement pro-oxydant de R évoqué en présence de tampon Locke semble confirmer dans le milieu DMEM SRP.

Quantités d'EROs (% fluorescence de DCF)

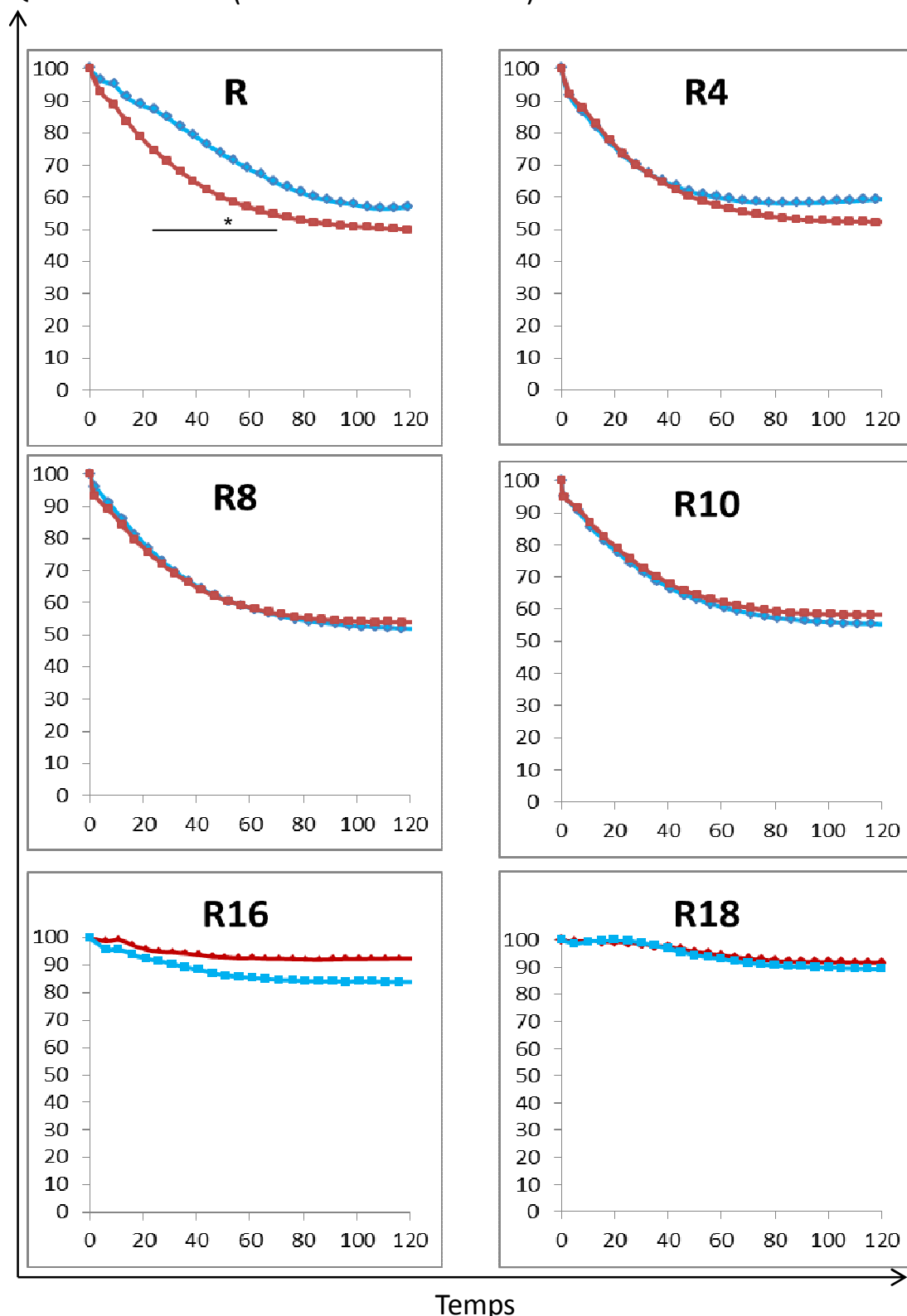
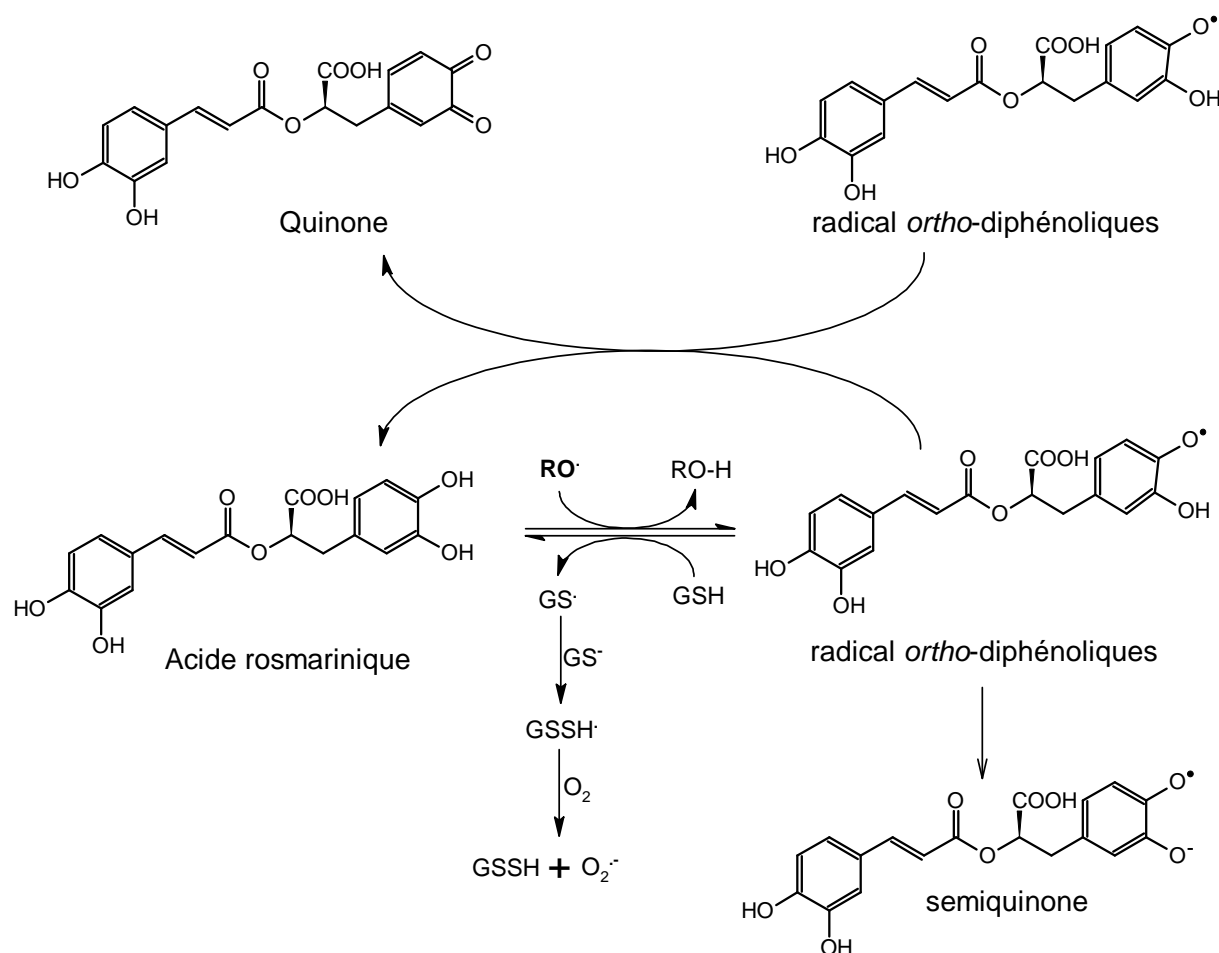


Figure 44 : Activité antioxydante des rosmarinates d'alkyle dans les cellules cultivées dans le DMEM SRP à pH= 7,2, à 37 °C et à 25  $\mu\text{M}$  (bleu) et à 5  $\mu\text{M}$  (Rouge). La quantité d'EROs est estimée en fonction du pourcentage de fluorescence du DCF, \* $p < 0,05$ , test ANOVA  $n=3$



Cet effet pro-oxydant pourrait s'expliquer par les deux fonctions catéchols présentes sur l'acide rosmarinique susceptibles de s'oxyder en radical ortho-diphénolique (Pirker *et al.*, 2009). Les capacités pro-oxydantes de R ont été étudiées par Munoz *et al.* (2012) qui ont démontré que la dégradation de l'acide rosmarinique en semiquinones était en effet responsable de cette action pro-oxydante. Galati *et al.* (1999) ont proposé, quant à eux, un mécanisme basé sur la réaction entre le glutathion (GSH) et les flavonoïdes. Ces polyphénols sont en effet sous forme semiquinone après avoir cédé leur hydrogène. Leur réduction via le tripeptide (GSH) oxyde ce dernier en radicaux thiyles ( $GS^\bullet$ ). Ces radicaux peuvent générer à leur tour des radicaux libres susceptibles d'initier la formation d'anions superoxydes (**figure 45**).



**Figure 45 : Modification de la concentration d'EROs intracellulaires par l'acide rosmarinique : couplage des activités antioxydantes et pro-oxydantes**

Les travaux de Locatelli *et al.* (2008) ont confirmé ce mécanisme en montrant une diminution de la concentration en GSH dans des cellules traitées avec les esters d'alkyle d'acide gallique. Ce mécanisme a également été observé avec la quercétine (Metodiewa *et al.*, 1999) et pourrait donc être étendu à l'acide rosmarinique. En effet, sa localisation dans le cytoplasme lui permet d'interagir avec des molécules comme le glutathion. Néanmoins, la résultante de l'équilibre entre ses activités pro et anti oxydantes permet à l'acide rosmarinique d'être considéré comme un antioxydant. Il est probable qu'un tel équilibre intervient également dans la détermination de l'effet antioxydant de l'ensemble des rosmarinates d'alkyle.

L'un des résultats les plus intrigants de cette série d'expériences concerne l'influence du milieu de culture sur l'activité antioxydante de l'acide rosmarinique et de ses esters. Dans le tampon Locke comme dans le DMEM SRP, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> démontrent une bonne efficacité, alors que R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> s'avèrent pratiquement inactifs. Par contre, R et R<sub>4</sub> ont une activité antioxydante importante, et équivalente à celle de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> dans le milieu DMEM SRP, et plus réduite dans le tampon Locke. En effet, à 25 µM par exemple, R et R<sub>4</sub> réduisent de près de 40% la quantité d'EROs intracellulaires dans le DMEM SRP contre 19% (R) et 25% (R<sub>4</sub>) dans le tampon Locke. Ces phénomènes pourraient s'expliquer par une accélération de l'entrée de ces dernières dans la cellule dans le tampon Locke, avec deux conséquences : un effet antioxydant rapide pendant les premières minutes du traitement associé à l'accumulation initiale dans la cellule, qui va également se traduire par une manifestation plus marquée de l'activité pro-oxydante de ces molécules.

Par ailleurs, la décroissance de la quantité d'EROs pendant le traitement des cellules par R, R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> est différente dans les deux milieux. En effet, alors qu'elle est progressive dans le DMEM SRP, elle s'avère rapide au cours des 10 premières minutes de traitement dans le tampon Locke, puis est considérablement ralentie. Cette accélération initiale demeure inexpliquée, mais il est possible que le tampon Locke modifie la perméabilité membranaire à l'acide rosmarinique et à ses esters.

### 1.1.1 Comparaison des effets à court et long termes des phénolipides

Par la suite pour comparer les résultats concernant l'effet des rosmarinates sur une courte période avec ceux obtenus après 24 heures de traitement (partie 2, paragraphe 1, **figure 38**), nous avons choisi l'étude cinétique dans le DMEM SRP qui se rapproche du milieu de culture utilisé à 24 heures (**figure 46**).

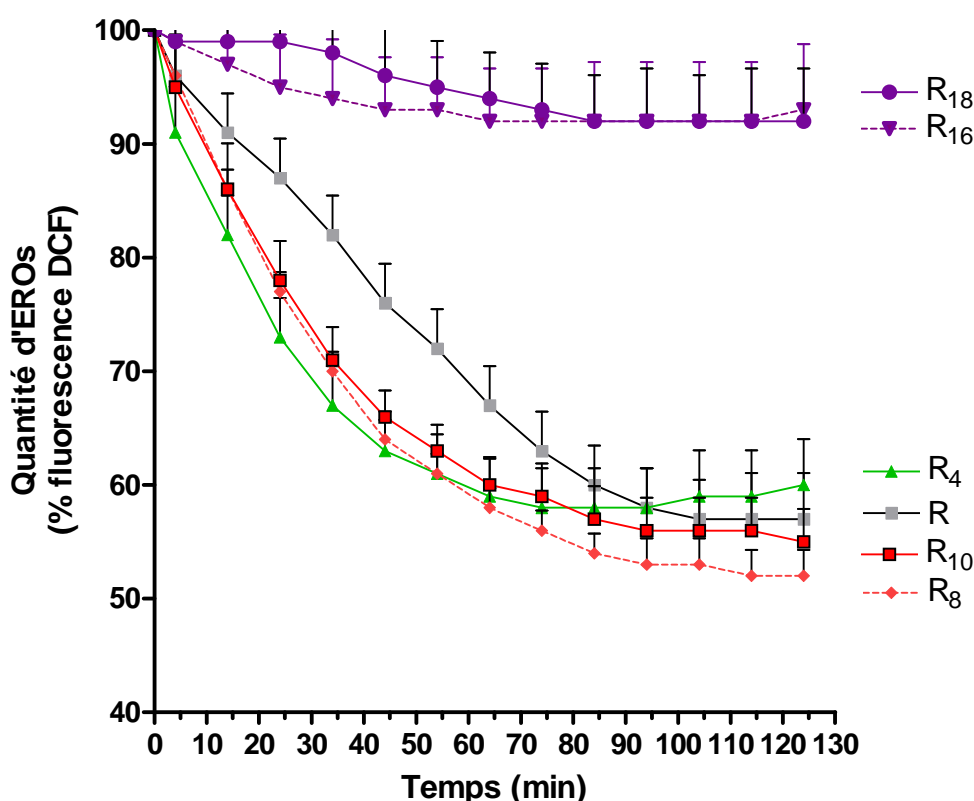


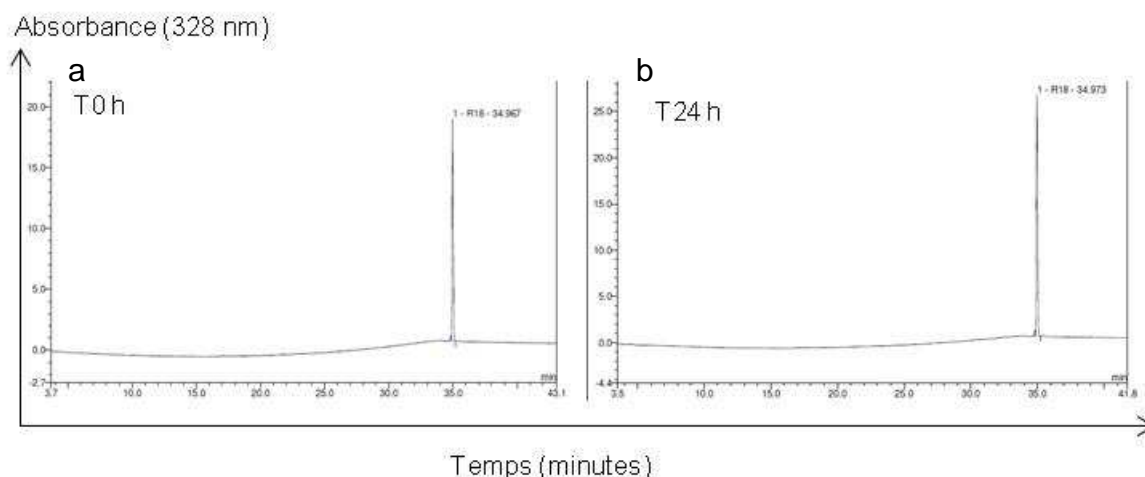
Figure 46 : Evolution dans le temps de la quantité d'EROs cellulaires en présence des rosmarinates d'alkyle à 25  $\mu\text{M}$  pendant 2h, à 37 °C dans le DMEM. La quantité d'EROs est exprimée en fonction du pourcentage de la fluorescence initiale de la DCF normalisée par rapport à la quantité d'ADN.

A la concentration de 25  $\mu\text{M}$ , à l'issue de 24 heures de traitement, R<sub>18</sub> induit une diminution des EROs intracellulaires de 46% (partie 2, paragraphe 1, **figure 38**) ; cette diminution est plus marquée que celle enregistrée pour l'acide rosmarinique, R<sub>4</sub> et R<sub>16</sub> (de l'ordre de 36%) bien que la différence ne soit pas significative entre ces phénolipides. Elle est par contre nettement plus importante pour R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> (respectivement de 73% et 69%,  $p < 0,001$ ). Ces deux derniers phénolipides se

distinguent donc des autres molécules par une efficacité accrue, retrouvée dans l'ensemble de nos travaux. Les résultats obtenus après un traitement de deux heures sont assez différents puisque seuls  $R_{16}$  et  $R_{18}$  se distinguent des autres rosmarinales d'alkyle avec une activité antioxydante faible à ce stade (diminution de 5% des EROs, **figure 46**). En effet, R,  $R_4$ ,  $R_8$  et  $R_{10}$  réduisent la quantité d'EROs d'une manière similaire (38 à 45%). Il est toutefois possible d'observer que la réduction de la quantité d'EROs induite par l'acide rosmarinique s'opère plus lentement jusqu'à 75 minutes que celle enregistrée pour  $R_4$ ,  $R_{10}$  et  $R_{18}$  (**figure 46**).

Cet ensemble de résultats indique que la longueur de la chaîne alkyle greffée sur l'acide rosmarinique influence de manière complexe l'activité antioxydante de ces molécules. La vitesse d'internalisation des phénolipides dans la cellule constitue probablement un élément majeur qui détermine leur efficacité à court terme. Nos données suggèrent donc que la pénétration intracellulaire de R,  $R_4$ ,  $R_8$  et  $R_{10}$  s'opère de manière plus rapide que celle de  $R_{16}$  et  $R_{18}$  dont la lipophilie élevée limiterait leur aptitude à franchir la membrane cellulaire. De plus, la prise en compte des résultats obtenus après 20 minutes de traitement pourrait également refléter une vitesse d'internalisation de l'acide rosmarinique inférieure à celle de  $R_4$ ,  $R_8$  et  $R_{10}$ .

L'efficacité antioxydante des diverses molécules testées après 24 heures de traitement résulte d'un ensemble de paramètres, tels que la vitesse d'internalisation, la stabilité de la molécule dans le milieu de culture, son métabolisme cellulaire ou son pouvoir antioxydant intrinsèque. Nous avons donc testé, dans un premier temps, la stabilité des antioxydants étudiés dans un tampon phosphate à pH=7,2, équivalent au milieu de culture DMEM, selon le protocole détaillé dans le chapitre Matériels et Méthodes (section 2.3). Nous n'avons mis en évidence aucune hydrolyse significative de ces molécules sur une période de 24 heures, écartant ainsi la seconde hypothèse. A titre d'exemple, les chromatogrammes de  $R_{18}$  sont présentées **figure 47**.

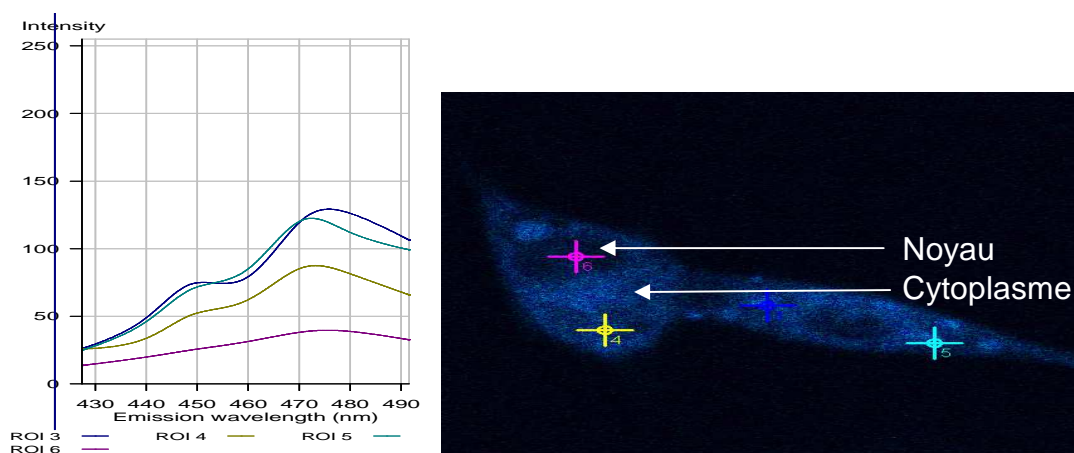


**Figure 47 : Chromatogrammes de la stabilité du rosmarinate d'octadécyle (25 µM) dans un tampon PBS à pH 7,2 à 37 °C pendant 24 h. a) T=0h, b) T=24h**

Nous avons donc étudié dans un second temps la vitesse d'accumulation de l'acide rosmarinique et de ses esters dans la cellule en observant directement l'évolution de l'auto-fluorescence associée à ces molécules en fonction du temps de traitement. Les mesures ont été effectuées à 15 minutes, temps auquel la réduction de la quantité d'EROs dans les cellules traitées par R, R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> est significative, à 35 minutes temps auquel R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> commencent à diminuer la quantité d'EROs et en fin de cinétique à 120 minutes puis après 24 heures de traitement.

## 2 Etude de la localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle

Cette étude a été réalisée sur des cellules vivantes car leur fixation conduit à la perméabilisation des membranes, provoquant ainsi la solubilisation des phénolipides. La localisation intracellulaire est observée par microscopie confocale grâce aux propriétés fluorescentes intrinsèques de l'acide rosmarinique. Cependant, comme la sensibilité de cette technique est limitée par l'autofluorescence modeste de ces molécules, l'étude a été réalisée en utilisant une concentration de 25 µM d'acide rosmarinique et de ses dérivés lipophilisés. Comme l'environnement influence le spectre d'émission, ce dernier a été directement déterminé sur les cellules. La bande d'émission spécifique dans ce milieu de culture a été délimitée en excitant ces composés à 405 nm (**figure 48**). La fluorescence émise par l'acide rosmarinique et ses esters est comprise entre 430 à 480nm.



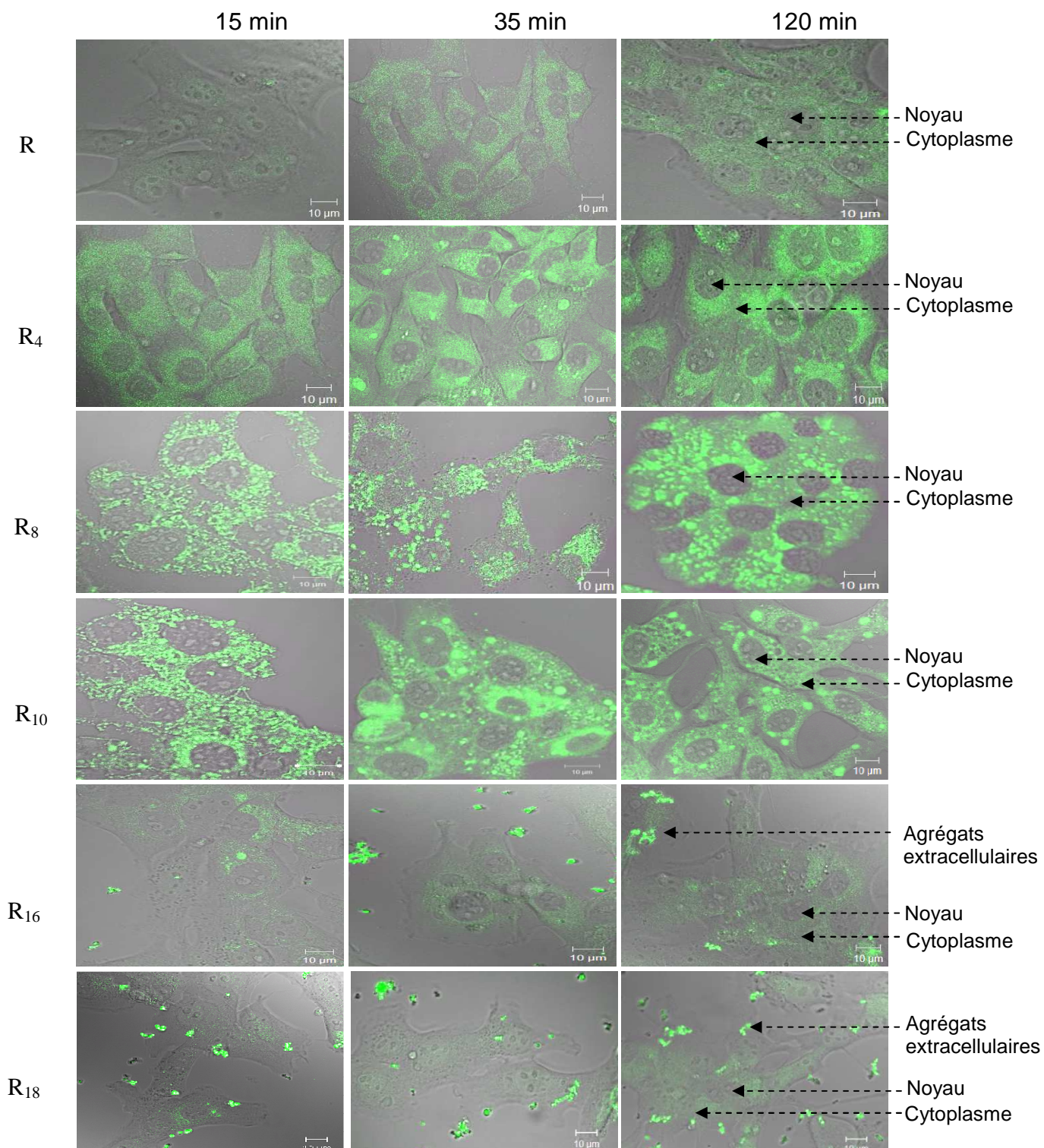
**Figure 48 : Spectre d'émission de R dans des cellules après 24 heures de traitement. En fonction des différentes zones excitées à 405 nm, le spectre d'émission est enregistré. Le curseur en mauve est localisé dans le noyau et les autres dans le cytoplasme.**

Le microscope n'étant pas équipé d'une chambre thermostatée permettant de réaliser des observations continues, l'étude a donc été effectuée en point finis sur des cellules traitées avec 25  $\mu$ M d'acide rosmarinique et de ses esters pendant 15, 35, 120 minutes et 24 heures dans le milieu de culture DMEM supplémenté en sérum.

## 2.1 Etude cinétique du transport et de la localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle

La première observation concerne la vitesse d'internalisation des molécules testées dans la cellule (**figure 49**). Après 15 minutes de traitement, la présence dans les fibroblastes est faible pour l'acide rosmarinique, ou très faible pour R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub>. Elle est beaucoup plus élevée pour R<sub>4</sub> et surtout R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>. La concentration intracellulaire de R augmente progressivement pour atteindre un maximum à 2 heures, qui reste néanmoins inférieur à celui atteint pour R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>. Malgré une pénétration intracellulaire très lente, la quantité de R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> dans les fibroblastes demeure très faible 2 heures après le début du traitement. En fait, des agrégats extracellulaires de ces deux composés apparaissent très nettement sur les images obtenues (**figure 49**).





**Figure 49 : Etude par microscopie confocale de l'entrée de l'acide rosmarinique et de ses esters à 25  $\mu$ M dans les fibroblastes en fonction du temps (15, 35 et 120 minutes). La fluorescence des phénolipides est représentée en vert.**

La seconde observation concerne la localisation des composés testés. Alors que R et R<sub>4</sub> présentent une localisation diffuse correspondant au cytosol, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> sont très clairement localisés dans des organites cellulaires ; leur répartition et leur abondance suggère qu'il peut s'agir des mitochondries. La faible quantité intracellulaire de R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> est cependant suffisante pour proposer une localisation cytosolique. Ces images infirment la possibilité que nous avons émise à diverses reprises d'un ancrage de ces deux phénolipides dans la membrane cellulaire ; la présence d'agrégats extracellulaires, associée à l'entrée très réduite de R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> dans les fibroblastes démontre que leur faible activité anti-oxydante résulte de leur capacité à s'auto-agréger, ce qui limite leur capacité à franchir la membrane plasmique.

Fadel *et al.* (2011) ont mentionné l'existence d'une interaction entre l'acide rosmarinique et les phospholipides des liposomes prédisant ainsi une possibilité d'ancrage de cet antioxydant dans la membrane plasmique. Comme pour R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub>, cette possibilité n'est pas vérifiée dans nos travaux. En effet, l'acide rosmarinique est essentiellement présent dans le cytoplasme. Son intensité de fluorescence, plus faible que celle de ses esters, montre que sa vitesse d'accumulation dans la cellule est plus réduite. Ces résultats indiquent que la capacité de l'acide rosmarinique à franchir la membrane cellulaire est plus faible que celle de ses esters R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>, ce qui diminue sa concentration dans les fibroblastes. Ces données sont donc en accord avec l'hypothèse présentée précédemment concernant l'impact de la charge négative de R limitant son passage à travers la membrane. De plus, ces résultats sont similaires à ceux des travaux de Lançon *et al.* (2004) montrant également une localisation cytosolique du resveratrol dans les hépatocytes humains.

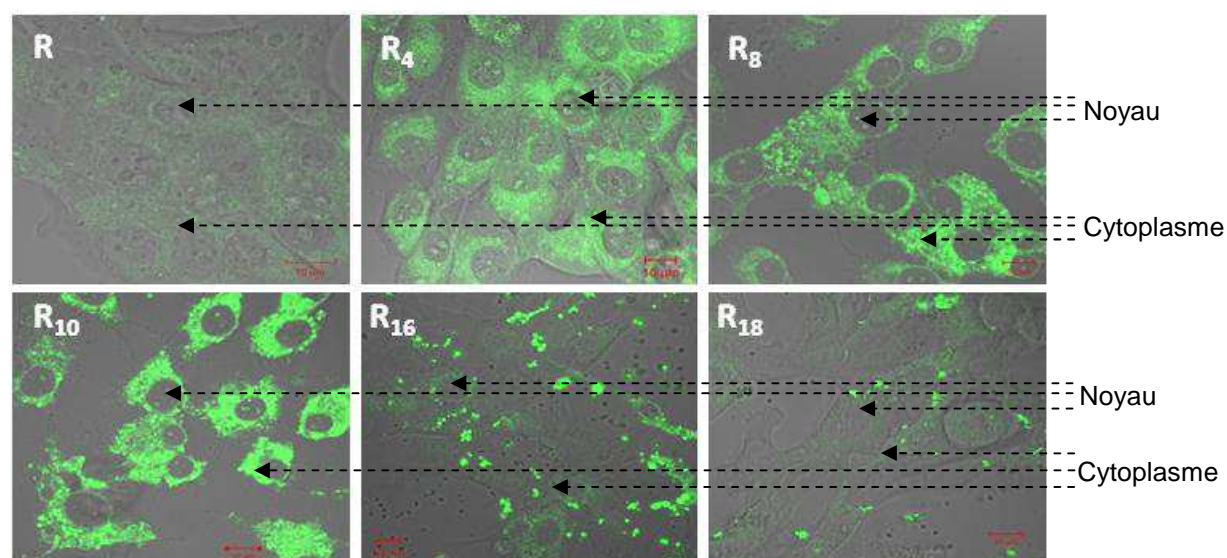
L'observation selon laquelle R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> entrent plus rapidement dans les fibroblastes que l'acide rosmarinique démontre que l'estérification d'une chaîne alkyle comprise entre 4 et 10 atomes de carbone améliore le transport de cet antioxydant à travers la membrane plasmique. L'importance du paramètre que constitue l'hydrophobie a également été démontrée en greffant une séquence peptidique d'acides aminés hydrophobes (phénylalanine) sur l'octa-arginine, puisque ce procédé accélère son internalisation dans la cellule (Takayama *et al.*, 2012).



La localisation cellulaire mise en évidence par ces expériences s'avère particulièrement intéressante. En effet, l'acide rosmarinique et ses dérivés  $R_4$ ,  $R_{16}$  et  $R_{18}$  présentent une localisation cytosolique. Par contre,  $R_8$  et  $R_{10}$  ont une localisation punctiforme évoquant le réseau mitochondrial. Cependant, après 35 minutes, ces esters à moyennes chaînes alkyles sont également localisés dans des vésicules et/ou dans des agrégats (**figure 49**,  $R_{10}$ ).

## 2.2 Localisation intracellulaire des rosmarinates d'alkyle après 24 heures de traitement

La localisation intracellulaire a été déterminée de la même manière après 24 heures de traitement (**figure 50**).  $R$  et  $R_4$  demeurent localisés dans le cytosol.  $R_{16}$  et  $R_{18}$  sont en grande partie agrégés dans le milieu extracellulaire, mais une faible quantité est détectée dans le cytosol.  $R_8$  et  $R_{10}$  présentent à nouveau une localisation punctiforme ou vésiculaire.



**Figure 50 : Etude par microscopie confocale de la localisation intracellulaire de l'acide rosmarinique et de ses esters (25  $\mu$ M) (vert) dans les fibroblastes, 24 heures après le début du traitement**

La comparaison de ces résultats de localisation cellulaire avec ceux concernant l'activité antioxydante de ces molécules pendant les premières heures de traitement (**figure 50**) apportent les premiers éléments d'explication à l'effet «cut-off» mis en

évidence dans cette étude. La faible efficacité antioxydante des phénolipides à longue chaîne résulte en grande partie de leur difficulté à franchir la membrane plasmique. Leur activité antioxydante intrinsèque ne semble pas en cause dans la mesure où ces molécules s'avèrent aussi efficaces que l'acide rosmarinique ou R<sub>4</sub> après 24 heures de traitement (partie 2, paragraphe 1, figure 38), bien que leur concentration intracellulaire soit manifestement plus faible à 24 heures. Dans le même ordre d'idée, l'efficacité particulière de R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> s'explique en partie par leur grande vitesse d'internalisation (figures 49 et 50). Cependant, l'activité antioxydante plus importante de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> après un traitement de 24 heures suggère une efficacité supérieure à celle de R<sub>4</sub> ; la localisation particulière de ces deux esters de rosmarinates pourrait également être impliquée dans leur activité antioxydante à long terme.

## 2.3 Conclusions

Cet ensemble de résultats démontre donc que l'effet «cut-off» résulte en grande partie de la capacité des molécules testées à franchir la membrane plasmique, mais également de leur activité antioxydante intrinsèque. Par ailleurs, la présence de vésicules ou d'agrégats dans les fibroblastes traités avec R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> à partir de 25 minutes pose le problème de l'influence de ce phénomène sur la physiologie de la cellule, et en particulier de l'existence d'une toxicité éventuelle (Galluzzi *et al.*, 2007). Trois points ont été abordés dans la suite de cette étude : les problèmes d'internalisation dans la cellule liés à la formation de structure supramoléculaire dans le milieu de culture, l'identification de la localisation cellulaire punctiforme de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>, et l'éventuelle toxicité cellulaire de ces phénolipides.

### 3 Propriétés d'agrégations des rosmarinales d'alkyle

L'activité antioxydante des composés phénoliques n'est pas seulement gouvernée par leur capacité à piéger les radicaux libres mais également par leur capacité à s'organiser dans la phase aqueuse. En effet, ces molécules amphiphiles peuvent s'auto-associer en micelles ou sous forme lamellaire pour diminuer les interactions entre la chaîne carbonée et l'eau.

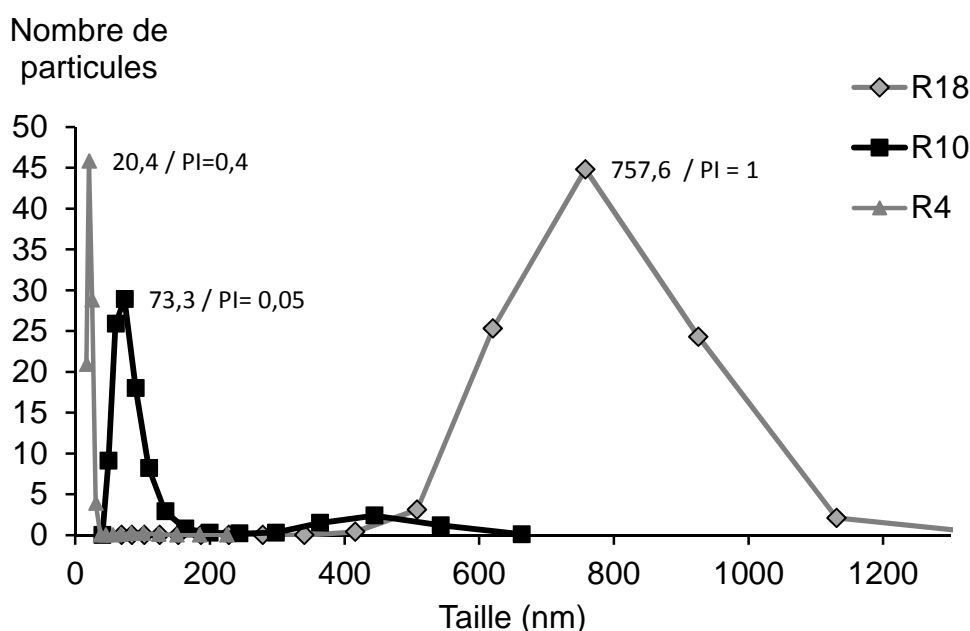
Une des hypothèses proposées pour l'étude du comportement non linéaire des chlorogénates et rosmarinales d'alkyle en émulsion huile dans eau était l'organisation sous forme de micelles des composés à longues chaînes lipidiques (Laguerre *et al.*, 2009). Cette hypothèse a été émise et validée pour d'autres types de phénolipides : les tyrosols et hydroxytyrosols d'alkyle. En effet, les travaux de l'équipe de Morales ont montré que ces molécules pouvaient former des micelles en solutions aqueuses à des concentrations supérieures à leur concentration micellaire critique (CMC) comprises entre 0,002 et 0,0055  $\mu\text{M}$  (Lucas *et al.*, 2010).

Par conséquent, suite aux observations effectuées par microscopie confocale et compte tenu des propriétés amphiphiles des phénolipides, nous avons déterminé par DLS (Dynamic Light Scattering ou diffusion dynamique de la lumière) la taille des particules, puis la CMC du rosmarinate de décyle par un tensiomètre à goutte.

#### 3.1 Détermination de la taille des rosmarinales d'alkyle en phase aqueuse par DLS

Pour étudier les propriétés d'auto-agrégation des rosmarinales d'alkyle dans les deux milieux de culture précédemment utilisés, le tampon Locke et le DMEM SRP, la taille des particules a été mesurée par DLS avec un appareil zetasizer. Cette technique nous permet également d'estimer l'homogénéité de l'échantillon en fonction de la valeur de l'index de polydispersité (PI). Lorsque le PI est inférieur à 0,1 le système est monodisperse et supérieur à 0,1, la distribution des particules est plus étendue. De plus, comme la température influence la solubilité et l'organisation des composés, chaque solution a été incubée à 37 °C afin d'être le plus proche possible des conditions de culture cellulaire.

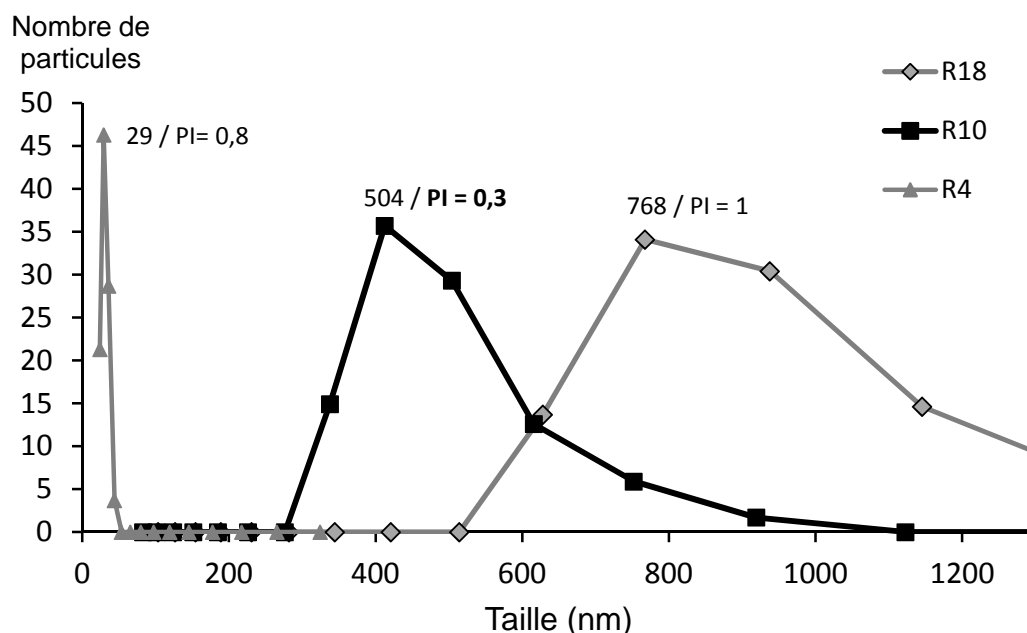
Dans le tampon Locke, les mesures par DLS ont montré que la taille des particules, formées par les phénolipides, augmente en fonction de la longueur de la chaîne alkyle (**figure 51**). Nous pouvons également remarquer que la distribution de taille de  $R_4$  et  $R_{10}$  est moins étendue que celle de  $R_{18}$ . En effet, la polydispersité (PI) du rosmarinate de décyle est inférieure à 0,1 ce qui indique que le système est homogène. Nous pouvons donc avancer l'hypothèse que la structure chimique de  $R_{10}$  semble favoriser ses propriétés d'auto-assemblage et par conséquent améliorer sa solubilité dans la phase aqueuse (tampon Locke).



**Figure 51 : Taille (nm) des particules des rosmarinates d'alkyle ( $R_4$ ,  $R_{10}$  et  $R_{18}$ ) à 25  $\mu$ M dans le tampon Locke en fonction de leur distribution en nombre (PI= polydispersité du système)**

Dans le DMEM SRP (**figure 52**), la taille et la polydispersité des particules sont supérieures indiquant que le comportement des phénolipides est influencé par la composition du milieu de culture. En effet, la taille des particules formées par  $R_4$ ,  $R_{18}$  et  $R_{10}$  est supérieure à celle observée dans le tampon Locke.

La présence d'agrégats identifiés en microscopie confocale suggère que ces structures supramoléculaires ont une faible solubilité dans le milieu de culture susceptible de limiter fortement la capacité de  $R_{18}$  à traverser la membrane.



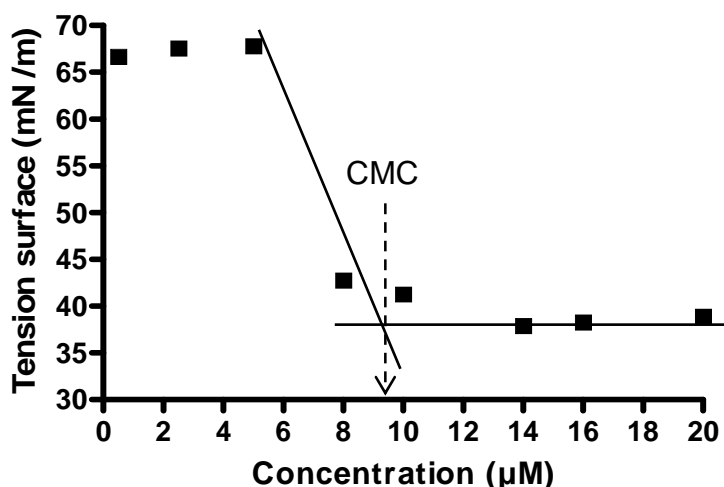
**Figure 52 : Taille (nm) des particules des rosmarinates d'alkyle (R<sub>4</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>18</sub>) à 25 µM dans le DMEM sans rouge de phénol en fonction de leur distribution en nombre (PI= polydispersité du système)**

Les données obtenues à partir de la cinétique de la production d'EROs pendant 2 heures de traitement suggéraient une meilleure solubilité des phénolipides dans le tampon Locke. Cette étude ne nous permet pas de conclure sur les propriétés de solubilisation du tampon Locke mais apporte une information supplémentaire concernant cette hypothèse. En effet, la taille des particules et la polydispersité sont plus faible en présence de ce tampon que celle observée dans le DMEM constitue un paramètre favorable à une meilleure solubilité.

### **3.2 Détermination de la concentration micellaire critique de R10 par un tensiomètre à goutte**

R<sub>10</sub> semble être à la fois être localisé dans des organites cellulaires et dans le cytoplasme sous forme d'agrégats détectables après 2 et 24 heures de traitement. L'étude des propriétés d'auto-agrégation des phénolipides passe nécessairement par l'évaluation de la concentration micellaire critique. Pour R<sub>10</sub>, la valeur de CMC

mesurée par un tensiomètre à goutte à 37  C dans le PBS (tampon phosphate à pH 7,2) est de 9  M (**figure 53**).



**Figure 53: Concentration micellaire critique du rosmarinat  de décyle estimée par la tension de surface en fonction de la concentration dans un tampon phosphate (PBS)   pH=7,2**

Nous pouvons donc supposer qu'à 25  M, R<sub>10</sub> s'assemble sous forme de micelles. Ce phénomène d'auto-agrégation pourrait notamment survenir à l'intérieur de la cellule. Pour tester cette possibilité, nous avons mesuré sa concentration intracellulaire après 2 heures de traitement, qui atteint 20  M, valeur supérieure à sa CMC. Ces données sont donc en faveur de la formation d'agrégats dans le cytosol.

Cependant, la taille des particules (504 nm) déterminée par DLS dans le DMEM SRP est supérieure à celle d'une micelle. La présence d'interactions pi-pi (pi-stacking) est impliquée dans la formation de structures supramoléculaires du resveratrol (Bonechi *et al.*, 2008). Ainsi, ses interactions non covalentes entre les cycles aromatiques pourraient expliquer la taille des particules formées par R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> dans le cytoplasme. Par ailleurs, l'association de ces molécules peut également impliquer des liaisons hydrogènes entre les phénols, ce qui tendrait à renforcer la cohésion de l'assemblage supramoléculaire.

### 3.3 Conclusions

Les capacités de  $R_{16}$  et  $R_{18}$  à traverser les membranes plasmiques semblent limitées par leur caractère très hydrophobe qui engendre la formation d'agrégats à l'extérieur de la cellule. Cette observation est confirmée par l'analyse DLS dont la taille des particules est de 768 nm pour  $R_{18}$  dans le DMEM. Ainsi, la diminution de l'activité antioxydante avec ces phénolipides qui est corrélée à la taille des particules intervient donc dans l'explication de l'effet «cut-off».

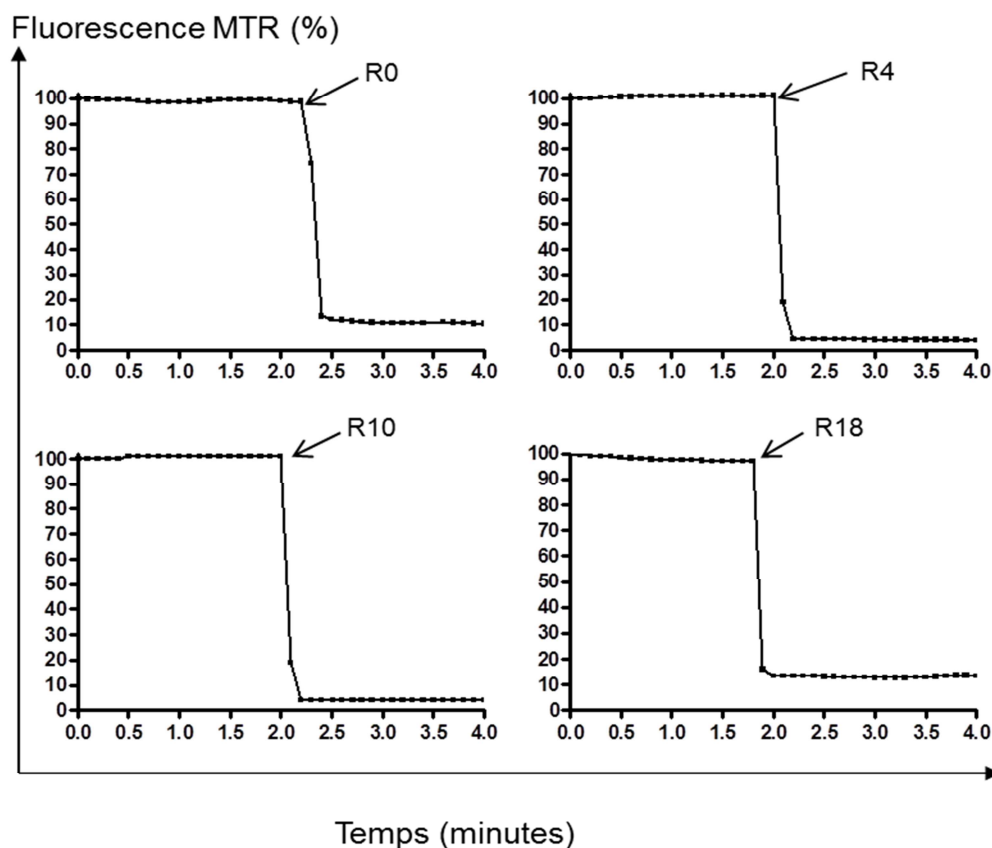
Par ailleurs, la formation d'agrégats intracellulaires observés sur les cellules traitées par  $R_{10}$  est en accord avec la mesure de sa CMC suggérant qu'à une concentration intracellulaire supérieure à 9  $\mu\text{M}$ ,  $R_{10}$  s'auto-assemble. La forte accumulation de ce phénolipide dans la cellule explique sa particulière efficacité antioxydante. Cependant, la formation d'agrégats ou de vésicules intracellulaires pourrait également induire une certaine cytotoxicité, hypothèse que nous testerons dans la suite de ce travail.

## 4 Etude de la localisation intracellulaire de $R_{10}$

### 4.1 Détermination *in vitro* de l'inhibition du mitotracker par les rosmarinates d'alkyle

Nous avons précédemment montré que  $R_8$  et  $R_{10}$  présentent une localisation punctiforme dans les fibroblastes après 15 minutes de traitement, ce qui suggère que ces molécules pourraient être adressées dans les mitochondries. Pour tester cette hypothèse en utilisant seulement  $R_{10}$ , nous nous sommes appuyés sur la propriété de l'acide rosmarinique et de ses esters, mise en évidence dans le cadre de cette étude, à inhiber la fluorescence d'une sonde spécifique des mitochondries : le mitotracker red (MTR). Cette méthode de quenching de fluorescence est largement utilisée dans l'étude de diverses interactions moléculaires. Elle a notamment été employée pour démontrer la localisation mitochondriale de l'adaphostine (Le *et al.*, 2006), molécule qui inhibe la fluorescence du MTR.

Dans un premier temps, nous avons donc testé la possibilité que l'acide rosmarinique et ses dérivés inhibent la fluorescence du Mitotracker. Les résultats obtenus pour R<sub>4</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>18</sub> à 540 nm sont présentés **figure 54**.



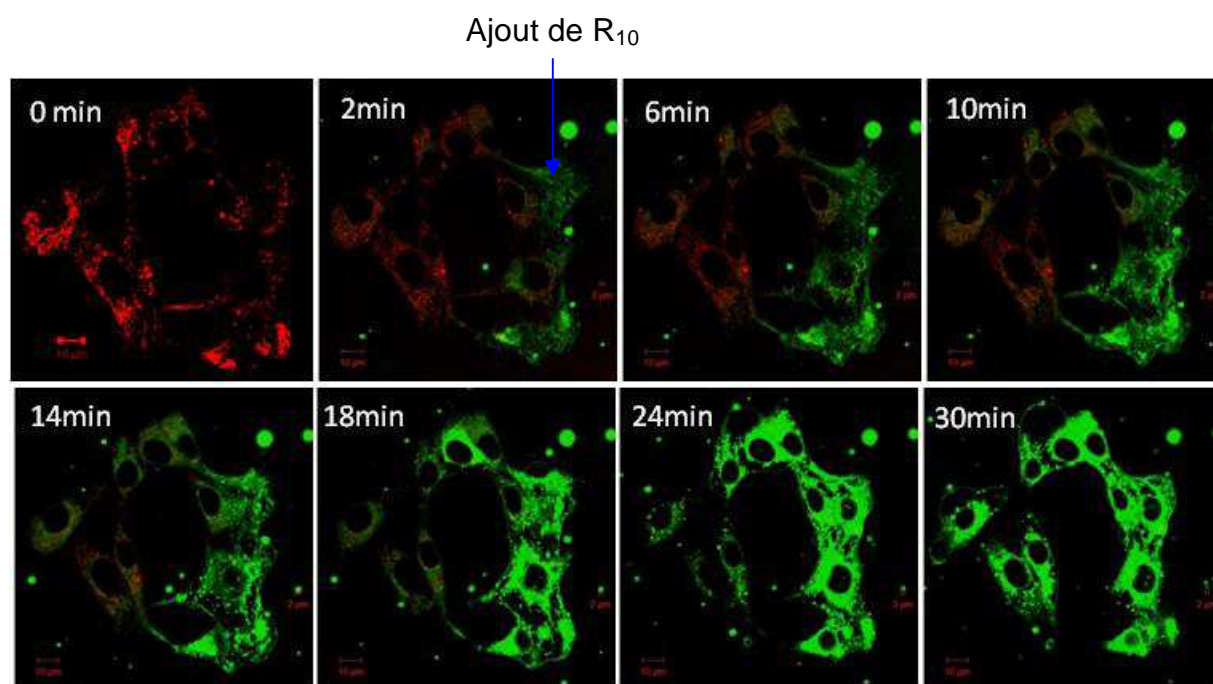
**Figure 54 : Inhibition de la fluorescence du Mitotracker red (10  $\mu$ M) par R, R<sub>4</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>18</sub> à 10  $\mu$ M dans un tampon phosphate à pH=7,2 et à 37 °C. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence initiale**

Quel que soit le phénolipide testé, son addition dans le tube contenant le MTR inhibe immédiatement la fluorescence émise par ce marqueur mitochondrial. Ces résultats démontrent donc que, comme l'adaphostine, les alkyles de rosmarinate induisent un « quenching de fluorescence » qui ne peut survenir que si les deux molécules testées interagissent entre-elles ou sont extrêmement proches spatialement. Par conséquent, l'extinction de la fluorescence du MTR, possédant une localisation spécifiquement mitochondriale, par un rosmarinate donné, démontrera sa localisation dans l'organe.



## 4.2 Evolution dans le temps de la localisation mitochondriale de R<sub>10</sub> dans le tampon Locke

Nos premières expériences ont été réalisées dans le tampon Locke, avec un traitement avec R<sub>10</sub> pendant 30 minutes. Comme nous l'avons vu précédemment, dès les premières minutes, l'activité antioxydante du phénolipide est améliorée dans ce tampon. Sur les images présentées, la fluorescence du MTR apparaît en rouge, celle du R<sub>10</sub> en vert (**figure 55**).



**Figure 55 : Evolution de la fluorescence du MTR (rouge) en fonction du temps dans les fibroblastes traités par R<sub>10</sub> (25 µM) (vert) dans le tampon Locke par microscopie confocale**

Dès la deuxième minute de traitement par le rosmarinat de décyle, la fluorescence émise par le MTR est considérablement abaissée, pour disparaître après 18 minutes. Cette analyse nous permet d'observer qu'après un adressage très rapide de R<sub>10</sub> dans les mitochondries, cette molécule s'accumule ensuite, au fur et à mesure de son internalisation, dans le cytoplasme.

### 4.3 Etude de la co-localisation mitochondriale de R<sub>10</sub> après 2 et 24 heures de traitement

Pour s'assurer que le tampon Locke, susceptible de modifier le franchissement de la membrane plasmique par les rosmarinates, n'influence pas les résultats, l'expérimentation a été effectuée à nouveau en cultivant les cellules avec le milieu classique DMEM. Dans ces images, le réseau mitochondrial est marqué en rouge par la fluorescence du MTR, et les phénolipides apparaissent en vert (**figure 56**).

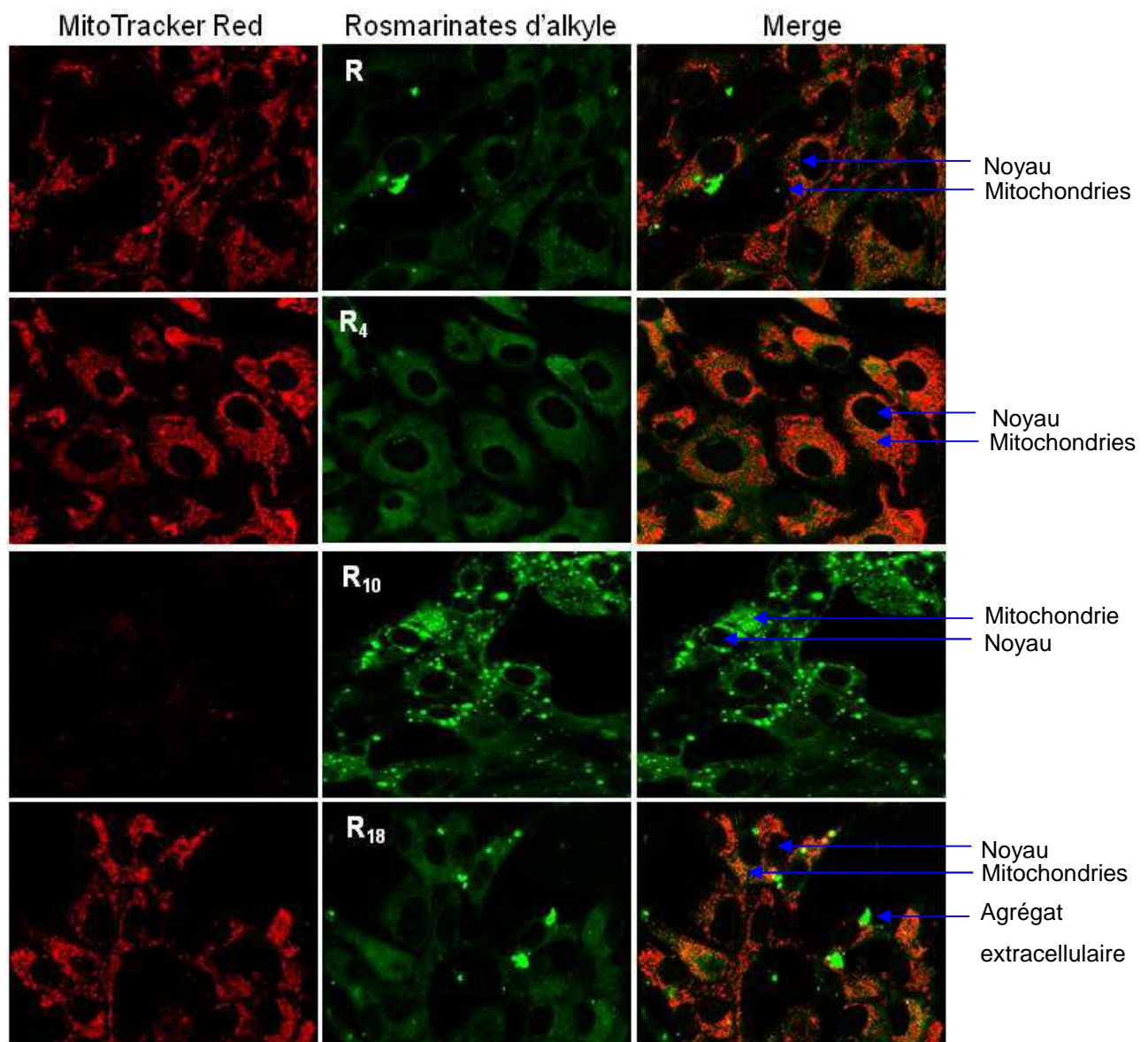
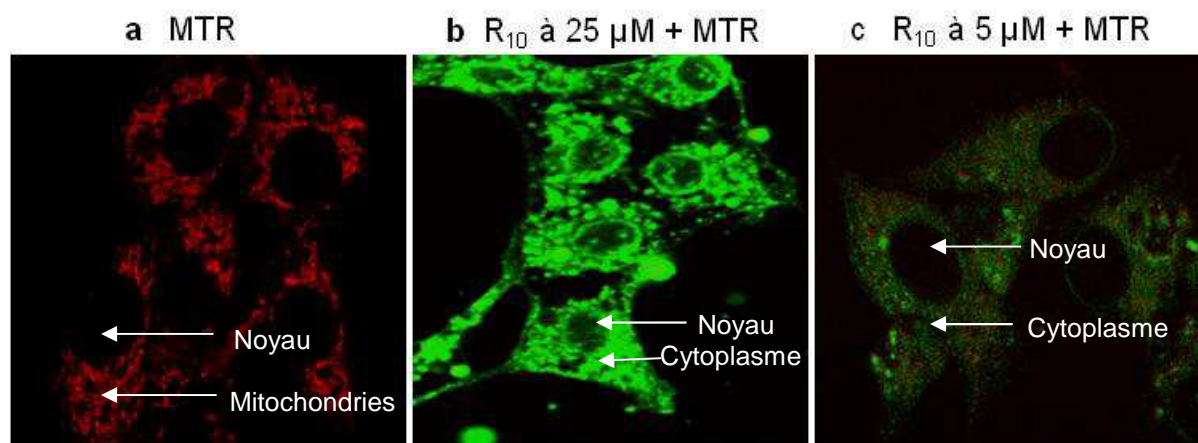


Figure 56 : Localisation des rosmarinates d'alkyle à 25  $\mu$ M (vert) et des mitochondries marquées avec le MTR (rouge) après 2 heures de traitement dans le DMEM+sérum à 37 °C.

Après deux heures de traitement par R, R<sub>4</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>18</sub>, seul R<sub>10</sub> abroge pratiquement la fluorescence du MTR. En l'absence d'extinction de ce signal par R, R<sub>4</sub> et R<sub>18</sub>, qui possèdent au même titre que R<sub>10</sub> la capacité de quencher la fluorescence du MTR, ces données démontrent sans ambiguïté que seul R<sub>10</sub> est co-localisé avec le MTR, ce qui nous permet de conclure à sa localisation mitochondriale.

Nous avons précédemment montré qu'après 24 heures de traitement, R<sub>10</sub>, à une concentration de 25 µM, réduisait la quantité d'EROs intracellulaires de 80%, mais qu'il possédait également une activité anti-oxydante importante (56% de réduction) dès la concentration de 5 µM (partie 2, paragraphe 1, figure. 38). Afin de vérifier sa localisation dans les mitochondries, quelle que soit sa concentration, nous avons utilisé la microscopie confocale pour la concentration de 25 µM et la microscopie biphotonique pour celle de 5 µM (**figure 57**). En effet, à cette concentration, sa détection nécessiterait d'augmenter la puissance du laser du microscope confocal avec une élévation très importante du bruit de fond.

Comme précédemment, R<sub>10</sub>, quelle que soit sa concentration, inhibe la fluorescence du MTR après 24 heures de traitement (**figure 57**). Ceci démontre que, à 5 µM comme à 25 µM, ce phénolipide possède une localisation mitochondriale. De plus, alors que sa plus forte concentration est associée à l'apparition de vésicules ou d'agrégats, seule la structure punctiforme du réseau mitochondrial est observée avec la concentration la plus faible. Précédemment nous avons proposé qu'à une concentration supérieure à celle de la CMC de R<sub>10</sub> (9 µM), ce phénolipide s'organise en micelles. L'absence d'agrégats dans les cellules en présence d'une concentration de rosmarinate de décyle inférieure à la CMC est en accord avec une telle possibilité. Cependant, il a été décrit récemment que les polyphénols tels que le resveratrol, la catéchine, la quercétine, et le curcumin étaient impliqués dans l'autophagie contrôlant notamment le vieillissement cellulaire (Pallauf and Rimbach, 2013). Il n'est donc pas impossible que R<sub>10</sub>, à la concentration de 25 µM, puisse provoquer la formation de vésicules d'autophagie, parallèlement à celle des micelles. De manière intéressante, utilisé à la concentration de 5 µM, il n'induit pas la formation de vacuoles ou d'agrégats. L'autophagie conduisant dans bien des cas à la mort cellulaire, ces données nous ont donc conduits à tester l'influence cytotoxique des phénolipides en fonction de la dose administrée.



**Figure 57 : Etude de la co-localisation du rosmarinate de décyle (vert) et des mitochondries après 24 heures de traitement. Toutes les cellules sont marquées par le MTR (rouge). a) Cellules non traitées, b) Cellules traitées avec R<sub>10</sub> à 25µM, c) Cellules traitées avec R<sub>10</sub> à 5 µM**

Dans cette partie du travail, nous avons donc confirmé la localisation mitochondriale de R<sub>10</sub>, quelle que soit sa concentration, puisque nous l'avons mise en évidence à 5 et 25 µM. Cette localisation lui confère une activité antioxydante particulière puisqu'elle permet à ce phénolipide de neutraliser les EROs dès leur formation. La mitochondrie produit en effet des quantités importantes d'anions superoxydes qui sont converties en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la superoxyde dismutase, puis transférées dans le cytosol. Ces molécules sont donc susceptibles d'induire des dégâts cellulaires, que ce soit au niveau de la mitochondrie ou au niveau du cytoplasme, de la membrane plasmique et du noyau. La neutralisation de l'anion superoxyde par R<sub>10</sub> protège donc l'organite contre les phénomènes d'oxydation, mais freine également considérablement le transfert de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytosol, et assure donc une protection des autres compartiments cellulaires. Ce résultat, associé à la mise en évidence d'une internalisation rapide des phénolipides à chaîne moyenne dans la cellule, explique de manière satisfaisante l'activité antioxydante particulièrement marquée de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>. L'adressage mitochondrial a fait l'objet de nombreuses revues concernant les thérapies possibles contre le cancer (D'Souza *et al.*, 2011; Fulda, 2010 ; Edeas, 2011; Sheu, 2006). Deux stratégies ont donc été antérieurement proposées pour cibler la mitochondrie : la conjugaison d'antioxydants au triphénylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) et l'utilisation de peptides SS ou MPP

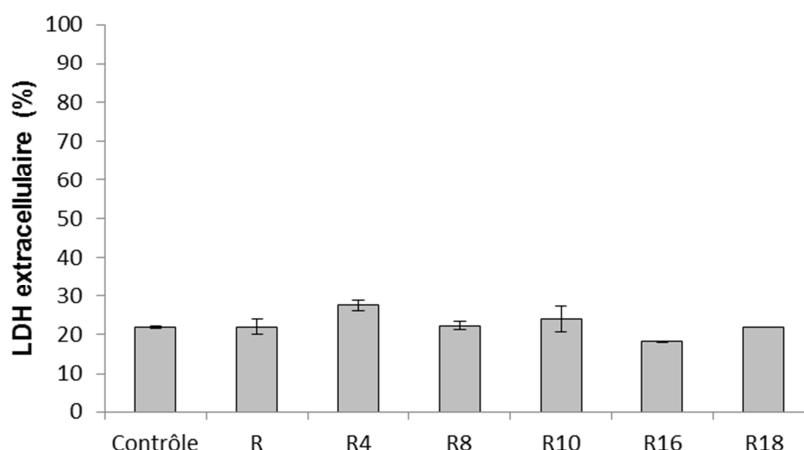
(Mitochondria Penetrating Peptides) (Szeto et Schiller) (Szeto, 2006). Nos travaux permettent de proposer une nouvelle stratégie avec le greffage d'une chaîne alkyle à 10 carbones sur une molécule antioxydante.  $R_{10}$  n'est pas chargé positivement, et son transport à travers la membrane interne mitochondriale n'est probablement pas favorisé. Néanmoins, sa chaîne alkyle lui permettrait de traverser la membrane externe. Cette localisation intramembranaire lui permettrait toutefois de piéger les EROs mitochondriaux.

#### 4.4 Conclusions

Les résultats issus de cette série d'expériences apportent un autre élément d'explication à l'effet «cut-off». Parallèlement, à leur grande vitesse d'internalisation dans la cellule, les rosmarinales d'alkyle à chaînes moyennes ( $R_8$  et  $R_{10}$ ) sont adressés dans la mitochondrie, organe majeur de production des EROs. Ainsi, en piégeant ces molécules dans l'organe, ils s'opposent à un transfert de  $O_2^{\bullet-}$  de la matrice mitochondriale vers le cytosol, sous forme d' $H_2O_2$ . De plus, sa présence dans le cytosol permet également de neutraliser les EROs présentes initialement dans ce compartiment. Cependant, à forte concentration,  $R_8$  et  $R_{10}$  apparaissent au sein de vacuoles qui pourraient refléter l'induction d'un processus d'autophagie ou d'agrégats susceptibles de conduire à la mort cellulaire. Cette observation nous a conduits à étudier la cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses phénolipides.

### 5 Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle

Plusieurs méthodes sont proposées pour déterminer la toxicité d'un composé. Une des conséquences de la mort cellulaire est la perméabilisation de la membrane plasmique. Ainsi, l'évaluation de l'intégrité de la membrane est l'une des techniques les plus utilisées. Un premier essai a été réalisé avec le kit LDH (Lactate déshydrogénase) à une concentration de 25  $\mu$ M. La libération de cette enzyme cytosolique résulte de la perméabilisation de la membrane lors de la mort cellulaire. La quantité de LDH libérée par les cellules traitées avec chaque rosmarinale d'alkyle n'est pas différente de celui des cellules témoins (**figure 58**).



**Figure 58 : Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle déterminée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH est exprimée en pourcentage de fluorescence de la résorufine**

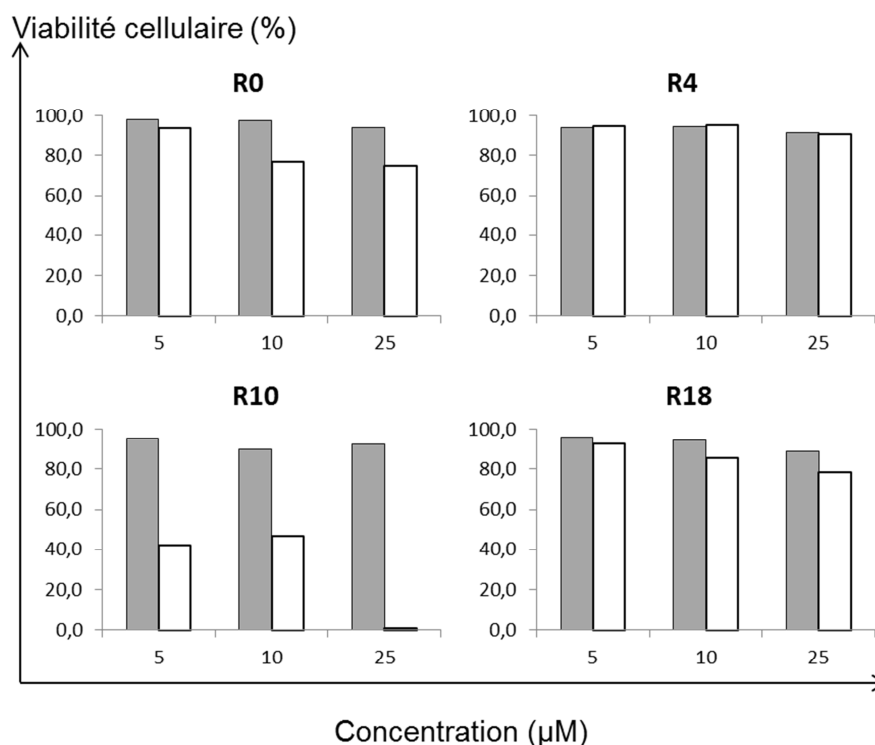
Ces données suggèreraient donc qu'aucun de ces antioxydants n'est cytotoxique. Cependant, un examen attentif des cultures cellulaires indique que R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> provoquent un décollement des cellules. De plus, les résultats concernant la LDH sont contradictoires avec l'observation d'altérations du tapis cellulaire, par microscopie optique, induites par un traitement avec R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>. Des résultats similaires ont été décrits par Wisman *et al.* (2008). Ces auteurs ont montré que les kits LDH et MTT n'étaient pas appropriés pour évaluer la toxicité des polyphénols.

Pour résoudre cette contradiction apparente, la cytotoxicité a été mesurée par cytométrie de flux. L'intégrité de la membrane a été testée par sa perméabilité à l'iodure de propidium (IP)

## 5.1 Cytotoxicité des rosmarinales d'alkyle après 2 heures de traitement

L'effet cytotoxique de R, R<sub>4</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>18</sub> a été évalué à trois concentrations différentes, 5, 10 et 25 µM, dans le tampon Locke et dans le DMEM SRP (**figure 59**). L'ensemble des données de l'analyse par cytométrie de flux est présentée en

annexe 1. La cytotoxicité est faible pour tous les esters dans le DMEM ; elle est cependant significativement plus élevée pour R et R<sub>10</sub> dans le tampon Locke. En effet, dans ces conditions, la quasi-totalité des cellules est engagée dans un processus d'apoptose ou de nécrose, caractérisé par la perméabilisation de la membrane plasmique.



**Figure 59 : Cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters alkyles en fonction de la concentration (5 ; 10 et 25 µM) après 2 heures de traitement dans le tampon Locke (blanc) ou dans le DMEM (gris). La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de fluorescence d'IP**

## 5.2 Cytotoxicité des rosmarinates d'alkyles à 24 heures

Nous avons également déterminé la cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters à plus long terme, après un traitement de 24 heures dans le DMEM (**figure 60**). Aucune mortalité cellulaire n'est observée jusqu'à la concentration de 10 µM, quel que soit le phénolipide testé. L'acide rosmarinique n'exerce aucun effet toxique quelle que soit la dose, et la cytotoxicité n'apparaît qu'avec la dose maximale testée (50 µM) pour R<sub>4</sub>. Une mortalité cellulaire très modérée mais significative est

détectée pour R<sub>8</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> à la concentration de 25  $\mu$ M (de l'ordre de 20%). R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> exercent un important effet cytotoxique à la dose de 25  $\mu$ M.

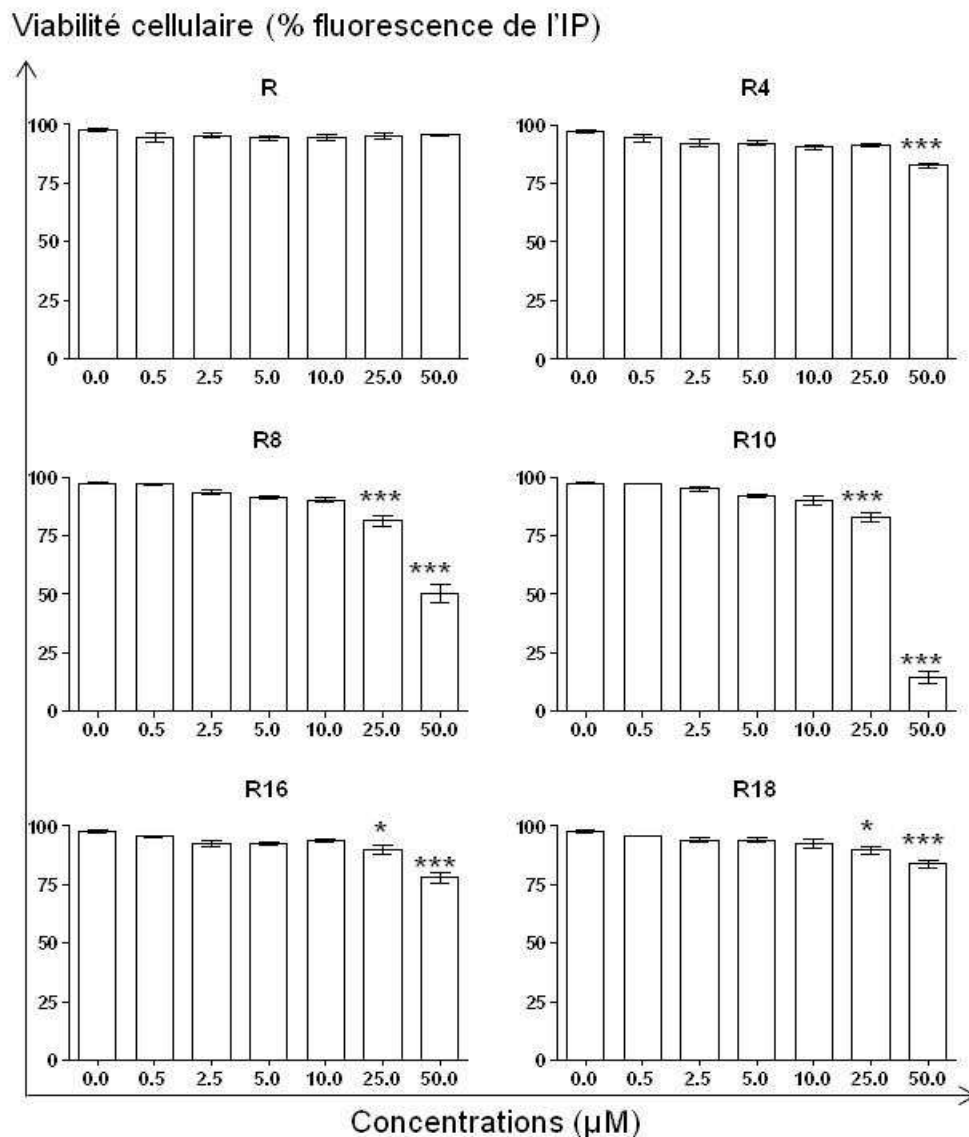


Figure 60 : Cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters sur la quantité d'EROs en fonction de la concentration (5 ; 10 et 25  $\mu$ M) après 24 heures de traitement dans le DMEM + sérum. La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de fluorescence d'IP et du nombre de cellules viables en absence de phénolipides. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA,  $n=3$



L'absence de cytotoxicité de l'acide rosmarinique a déjà été démontrée dans d'autres types cellulaires. Gao *et al.* (2005) ont d'ailleurs démontré que ce polyphénol possède une activité antiapoptotique dans les astrocytes, en inhibant l'activité de la caspase 3.

La formation des vésicules ou des agrégats précédemment rapportée pour ces deux phénolipides semble donc bien associer à une réduction marquée de la viabilité des fibroblastes. Parallèlement à la formation éventuelle de vésicules d'autophagie, les acides gras tels que l'acide linoléique, l'acide arachidonique ou l'acide palmitique peuvent causer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, associée à des altérations de la membrane cellulaire et de l'ADN. Chaque ester d'acide rosmarinique étant susceptible d'être hydrolysé dans la cellule et libérer ainsi des alcools gras, la cytotoxicité observée pour R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> pourrait également résulter de leur concentration intracellulaire élevée, résultant de leur grande efficacité à franchir la membrane plasmique.

Cependant, à 5 µM, R<sub>10</sub> n'engendre ni mort cellulaire ni la formation d'agrégats, et réduit de 56% la quantité d'EROs après 24 heures de traitement à 25 µM. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que sa cytotoxicité est directement corrélée à son accumulation dans la cellule et ne survient pas à des doses compatibles avec une activité antioxydante efficace.

### 5.3 Conclusions

L'effet cytotoxique des rosmarinates d'alkyle peut être classé dans l'ordre suivant : acide rosmarinique < butyle rosmarinate = rosmarinate d'hexadécyle = rosmarinate d'octadécyle < rosmarinate d'octyle < rosmarinate de décyle. Nous observons donc à nouveau un effet non linéaire, maximal pour R<sub>10</sub>, similaire à l'effet «cut-off» précédemment observé pour l'activité antioxydante. Ces résultats sont en accord avec les travaux concernant la cytotoxicité de dérivés de l'acide gallique qui ont révélé ce même effet non linéaire, le dérivé le plus toxique correspondant à celui lipophilisé par une chaîne alkyle à 12 atomes de carbone (Locatelli *et al.*, 2008). Cordova *et al.* (2011) ont étudié le mécanisme cytotoxique des gallates d'octyle et de dodécyle sur des cellules de mélanome de souris. Ces phénolipides induisent des dommages sur les lipides membranaires déclenchant une perméabilisation de la

membrane. L'expression des protéines proapoptotiques (Bax) est augmentée et celle des protéines antiapoptiques (BCl-2) est diminuée. Ils induisent également une dépolarisation des mitochondries, associée à une augmentation de l'activité des caspase-3. Lee *et al.* (2008) ont observé des effets similaires de l'acide rosmarinique à des concentrations de l'ordre de 50  $\mu\text{M}$  dans la régulation de l'apoptose. Ainsi, à forte concentration, le déclenchement de l'apoptose par  $\text{R}_{10}$  ou  $\text{R}_8$  pourrait être également impliqué dans la cytotoxicité pour ces phénolipides.

## 6 Mécanisme d'action des rosmarinates d'alkyle

L'étude de l'internalisation dans la cellule, de la localisation intracellulaire, des propriétés d'auto-agrégations et de cytotoxicité nous a permis de mieux comprendre l'influence de la longueur de la chaîne alkyle. Ainsi, nous pouvons proposer un mécanisme d'action en fonction de chaque groupe ( $\text{R-R}_4$ ,  $\text{R}_8\text{-R}_{10}$ ,  $\text{R}_{16}\text{-R}_{18}$ ).

L'acide rosmarinique, chargé négativement traverse moins facilement les membranes plasmiques que ses esters d'alkyle.  $\text{R}_4$  pénètre plus rapidement dans les cellules, tout en exerçant une activité antioxydante très modérée. Il semble donc que le greffage d'une chaîne alkyle de quatre carbones améliore le franchissement de la membrane plasmique sans modification de la capacité antioxydante intrinsèque. La faible activité de  $\text{R}_{16}$  et  $\text{R}_{18}$  à court terme, composés les plus apolaires, semble résulter uniquement d'une auto-agrégation dans le milieu de culture qui limite fortement leur vitesse d'entrée dans la cellule. Par contre, leur influence après 24 heures, alors que leur concentration cellulaire reste faible, suggère que le greffage de ces longues chaînes améliore leur activité antioxydante intrinsèque.

Le potentiel antioxydant de  $\text{R}_8$  et  $\text{R}_{10}$  résulte d'une entrée rapide dans la cellule, explicable par une lipophilie optimale pour le franchissement des membranes plasmiques. De plus, leur localisation mitochondriale constitue un paramètre clé de leur efficacité dans la mesure où ils neutralisent les EROs dans l'organite, bloquant leur transfert dans le cytosol.

Ces travaux apportent donc une nouvelle stratégie de prévention contre le stress oxydant. En effet, la lipophilisation de l'acide rosmarinique accroît considérablement son potentiel antioxydant lorsque la longueur de la chaîne alkyle

greffée est de 8 ou 10 atomes de carbone. Ce potentiel est d'ailleurs supérieur à celui enregistré pour deux antioxydants de référence, les vitamines E et C. De manière remarquable, le rosmarinate de décyle s'avère efficace à des concentrations n'induisant aucune mortalité cellulaire et semble donc adapté pour engager de futures études *in vivo* dans le cadre de pathologies associées à un stress oxydant telles que les maladies métaboliques.

## Partie IV : Résultats complémentaires

### 1 Activité antibactérienne des rosmarinates d'alkyle

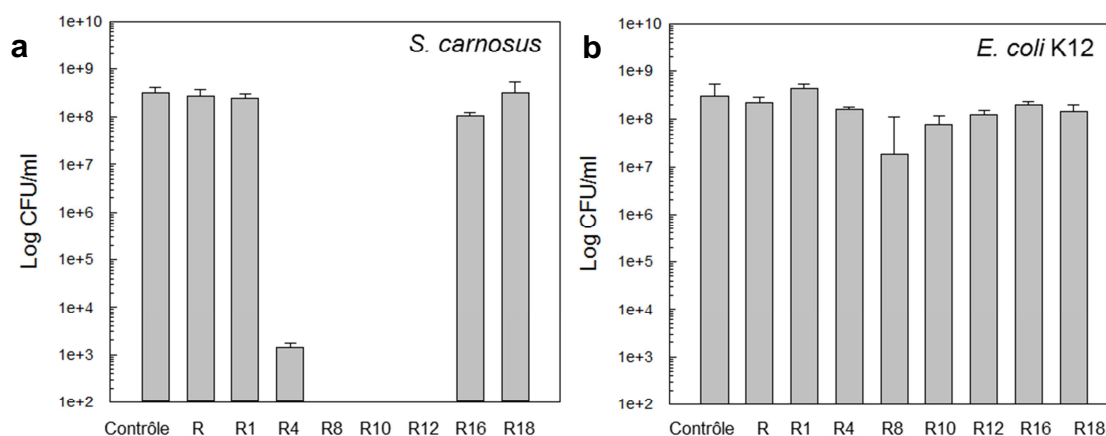
Une autre propriété des antioxydants a largement été étudiée en raison de leur activité antimicrobienne (Karlova *et al.*, 2010). Certains travaux ont montré que la lipophilisation des antioxydants améliorait leur activité antimicrobienne. Ainsi, la lipophilisation des sucro-esters, en particulier les esters de saccharose ou de glucose avec un acide dodécanoïque leur confère une forte action antibactérienne et antifongique. L'estérification de l'arginine avec l'acide laurique (arginate de décyle) a permis d'améliorer l'activité contre les bactéries Gram+ et Gram-, les levures et les champignons, par rapport à celle des molécules natives. Muroi *et al.* (2004) rapportent ainsi que l'activité antibactérienne des dérivés alkyles de l'acide anacardique contre *Staphylococcus aureus* (résistant à la méthicilline) dépend de leur lipophilie. Elle est en effet maximale pour un ester d'une longueur de chaîne à 10 et 12 atomes de carbone. Cet effet non linéaire a également été observé pour la même longueur de chaîne alkyle avec les esters de tyrosol (2012).

Ces observations nous ont conduits à évaluer l'activité antibactérienne de l'acide rosmarinique et de ses esters en collaboration avec l'équipe du Prof. Jochen Weiss de l'Université de Stuttgart (Allemagne). La lipophilisation de l'acide rosmarinique avec une chaîne alkyle améliore ses capacités antioxydantes en émulsion huile dans eau (Laguerre *et al.*, 2010). Il était donc intéressant de savoir si, parallèlement à leur capacité antioxydante, les rosmarinates d'alkyle avaient également des propriétés antibactériennes supérieures à celles de l'acide rosmarinique.

Pour faciliter l'incorporation des phénolipides dans le milieu de culture, ils sont préalablement solubilisés dans le DMSO, ce dernier n'affectant pas la croissance des bactéries (Ansel *et al.*, 1969). L'activité antibactérienne est déterminée sur deux types de souches : *Staphylococcus carnosus* (Gram +), souche non pathogène de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* K12 (Gram -).

La croissance bactérienne est mesurée pendant 48 heures, en présence de différentes concentrations de rosmarinates d'alkyle. Nous observons à nouveau une

influence anti-bactérienne non linéaire par rapport à la longueur de la chaîne alkyle. En effet, à la concentration de 300  $\mu\text{M}$ , les rosmarinales d'octyle ( $R_8$ ), de décyle ( $R_{10}$ ) et de dodécyle ( $R_{12}$ ) inhibent totalement la croissance de *Staphylococcus carnosus* alors que les rosmarinales d'alkyle à courtes chaînes alkyles (acide rosmarinique (R) et rosmarinate de méthyle ( $R_1$ )) et longues chaînes alkyles (rosmarinate d'hexadécyle ( $R_{16}$ ) et rosmarinate d'octadécyle ( $R_{18}$ )) n'exercent aucun effet (**figure 61, a**). Comme nous l'avons précédemment montré, à cette concentration, la solubilité de  $R_{16}$  et  $R_{18}$  dans le milieu de culture (phase aqueuse) est très faible et la formation d'agrégats peut limiter l'action de ces composés. *A contrario*, l'activité antibactérienne des rosmarinales d'alkyle sur *Escherichia coli* n'est pas significative (**figure 61, b**). La différence majeure entre ces deux souches réside dans la composition de leur paroi. Les bactéries Gram négatifs comportent deux membranes plasmiques phospholipidiques alors que les bactéries Gram positifs ne possèdent qu'une seule membrane plasmique recouverte par une paroi riche en peptidoglycanes et LPS (LiPoSaccharide). Ceci suggère que la membrane plasmique des bactéries Gram négatifs serait imperméable aux phénolipides.



**Figure 61 : Activité antibactérienne des rosmarinales d'alkyle estimée par le log CFU/mL en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Les souches *S.carnosus* (a) et *E.coli* K12 (b) sont traitées avec une concentration de 300  $\mu\text{M}$  pendant 24 heures**

La poursuite de cette étude a été développée par l'équipe du Prof. Weiss (Université de Stuttgart) qui a montré que  $R_{12}$ , qui possède la meilleure activité

antibactérienne, s'ancre dans la bicouche phospholipidique et entraîne sa désorganisation, contrairement aux composés polaires ( $R$ ,  $R_1$ ) ou apolaires ( $R_{16}$ ,  $R_{18}$ ) qui n'interagissent pas avec la paroi bactérienne.

## Conclusions et Perspectives

L'oxygène, bien qu'il soit un élément indispensable à la vie, induit la formation de composés toxiques : les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs). Leur extrême réactivité implique, qu'en excès, elles provoquent des dégradations cellulaires responsables de diverses pathologies comme le diabète, les maladies dégénératives ou certains cancers. Elles sont également impliquées dans les processus du vieillissement de l'organisme. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre l'efficacité des défenses antioxydantes endogènes et la production d'EROs.

L'apport d'antioxydants exogènes s'est avéré être une stratégie prometteuse pour prévenir des dommages oxydatifs. Parmi les antioxydants, les polyphénols suscitent un intérêt grandissant en raison de leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancérigènes. Cependant, administrés par voie orale, leur efficacité est limitée par leur polarité. A titre d'exemple, des expériences *in vivo* sur des rats ont montré que, pour traverser la barrière intestinale, l'acide rosmarinique était méthylé par la catéchol-O-méthyl transférase ou hydrolysé en acide caféique.

Pour améliorer leur biodisponibilité, la lipophilisation des polyphénols par une chaîne lipidique qui diminue leur polarité est une stratégie exploitée depuis plusieurs années. Cette méthode a déjà prouvé son efficacité dans les émulsions huile dans eau avec les chlorogénates et les rosmarinates d'alkyle qui limitent l'oxydation lipidique, mais également en culture cellulaire avec les chlorogénates et hydroxytyrosolates d'alkyle. Quel que soit le système (émulsions ou cellules), l'activité antioxydante maximale a été obtenue avec des esters à chaînes alkyles de 8 à 12 atomes de carbone. Cependant, l'efficacité particulière de la longueur de ces chaînes demeure inconnue. Dans ce contexte, l'objectif principal de ces travaux de thèse a été d'étudier l'influence du greffage de divers vecteurs lipidiques sur les propriétés antioxydantes de l'acide rosmarinique. Ainsi, des dérivés lipidiques de l'acide rosmarinique ont d'abord été catalysés par voie chimique et / ou enzymatique. Puis, leur potentiel antioxydant a été estimé sur culture cellulaire. Enfin, le mécanisme d'action des rosmarinates d'alkyle a été caractérisé en évaluant

notamment leur capacité à traverser la membrane, leur localisation intracellulaire et leur cytotoxicité.

Dans la première partie de ces travaux de thèses, deux séries d'esters d'acide rosmarinique ont donc été synthétisées par greffage d'une seule chaîne alkyle en utilisant un agent acylant de type alcool gras ou de deux chaînes de structure diglycéridique. Pour chacune de ces séries, les longueurs de chaînes greffées allaient de quatre à dix-huit atomes de carbones. En termes de stratégie de synthèse, nos travaux ont montré que la catalyse chimique des rosmarinates d'alkyle conduisait à de très bons rendements ( $\approx 90\%$ ). En revanche, l'estérification de dérivés diacylés de l'acide rosmarinique (rosmarinates de DAG) s'est avérée plus complexe. En effet, dans ce cas, une stratégie chimio-enzymatique multi-étapes a dû être mise au point. Elle a certes permis l'obtention des molécules désirées mais avec des rendements de synthèse globalement faibles : 8% pour les rosmarinates de DAG à courtes chaînes alkyles (RDAG<sub>5</sub>) et entre 30 et 47% pour ceux à moyennes et longues chaînes (RDAG<sub>8</sub>, <sub>12</sub> et <sub>18</sub>). Dans ce contexte, nous avons pu montrer que la catalyse enzymatique des esters de méthyle d'acide pentanoïque et octanoïque sur le rosmarinate de DAG est l'étape critique de la synthèse de RDAG<sub>5</sub> et RDAG<sub>8</sub>, alors que celle de la production du 1 rosmarinoyl 2,3 dilauroyl glycérol (RDAG<sub>12</sub>) et du 1 rosmarinoyl 2,3 dioctadécanoyl glycérol (RDAG<sub>18</sub>) est l'étape de purification par flash chromatographie. Le ratio substrat-enzyme, la nature du solvant (liquide ionique ou organique) ou les étapes de purifications seraient autant de paramètres à prendre en compte pour optimiser la synthèse de ces composés.

Une fois les deux séries de molécules obtenues en quantités suffisantes, la deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer leur activité antioxydante à l'aide d'un système cellulaire modèle. Ce dernier met en œuvre des fibroblastes humains génétiquement modifiés afin de produire des quantités importantes d'EROs mitochondriaux. Leur quantité a été estimée à l'aide d'une sonde fluorescente, cytoplasmique et sensible à l'oxydation : la DCFH<sub>2</sub>-DA.

Concernant la série des rosmarinates d'alkyle testée, nos résultats ont révélé que le rosmarinate de décyle était le plus efficace en réduisant la quantité d'EROs intracellulaires de l'ordre de 87% après 24 heures de traitement. Pour la série des rosmarinates de diacylglycérol, l'activité antioxydante était maximale avec le



1-rosmarinoyl-2,3-dilauroyl glycérol (RDAG<sub>12</sub>) qui diminuait la quantité d'EROS de 67% pour le même temps d'incubation. A ce stade, le résultat majeur de nos travaux réside dans le fait que, quel que soit le type de phénolipides, nous confirmons l'effet non linéaire du potentiel antioxydant des dérivés phénoliques. Cet effet «cut-off» est en effet similaire à celui précédemment observé au laboratoire (travaux de thèse de Mickaël Laguerre) sur les chlorogénates d'alkyle. Enfin, nous avons également montré que, d'une manière générale, les rosmarinates d'alkyle sont plus performants que les rosmarinates de diacylglycérol. Par conséquent, nous avons privilégié ces dérivés alkyliques pour la suite de nos travaux axés sur la compréhension de cet effet «cut-off».

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord comparé l'activité antioxydante de ces phénolipides avec celle de deux antioxydants largement répandus et utilisés tels que les vitamines C et E dont la synergie pour limiter la peroxydation lipidique est largement documentée. Dans le cadre de cette comparaison, nous avons utilisé les deux phénolipides les plus efficaces, à savoir R<sub>10</sub> et RDAG<sub>12</sub>. Les résultats obtenus ont montré que R<sub>10</sub> possède la meilleure activité antioxydante en milieu cellulaire. Dans nos conditions expérimentales, RDAG<sub>12</sub>, quant à lui, exprime une activité antioxydante moins élevée que R<sub>10</sub>, mais cependant plus efficace que celle de la vitamine E. En raison de leur lipophilie similaire (logP ≈ 10), nous avons alors supposé que RDAG<sub>12</sub> avait probablement une localisation au sein du milieu cellulaire identique à celle de la vitamine E, c'est-à-dire au sein de la bicouche phospholipidique. Cette hypothèse serait néanmoins à vérifier en évaluant la peroxydation lipidique par une sonde sensible à l'oxydation et ancrée dans la membrane telle que la BODIPY C11. De plus, la corrélation des résultats des deux sondes nous permettrait de prédire s'il est plus efficace de cibler les radicaux peroxydes dans la membrane, lieu de la peroxydation lipidique, ou de neutraliser en amont les EROs cytoplasmiques. Nous pourrions ainsi mieux définir la structure des futures molécules actives à tester en fonction de l'application recherchée. Un antioxydant capable de s'ancrer dans la bicouche phospholipidique des LDLs pourrait permettre de limiter leur oxydation et d'exercer un rôle préventif dans l'athérosclérose. *A contrario*, un antioxydant qui piégerait les EROs cytoplasmiques pourrait restreindre les dommages oxydatifs de l'ADN, des ARNs et des protéines cytosoliques.

Dans la dernière partie de nos travaux, nous avons d'abord montré l'influence du milieu de culture sur le comportement de ces molécules. Ainsi, nous avons observé que les activités antioxydantes et cytotoxiques du rosmarinate de décyle ( $R_{10}$ ) étaient amplifiées dans le tampon Locke alors que l'activité antioxydante de  $R$  était réduite. En effet, les analyses de cytotoxicité ont montré que  $R_{10}$  générait, dans ces conditions, 99% de mort cellulaire, biaisant ainsi l'estimation de ses capacités antioxydantes. Par conséquent, seules les analyses réalisées dans le DMEM sans rouge de phénol (SRP) nous ont semblé exploitables pour étudier le comportement de ces phénolipides.

Deux expérimentations ont été réalisées pendant une durée de 2 heures et 24 heures de traitement en suivant l'évolution dans le temps de la concentration d'EROS intracellulaires. Les résultats se sont avérés différents selon les phénolipides étudiés.

Après 2 heures de traitement, la diminution de la quantité d'EROs dans les cellules traitées par l'acide rosmarinique, le rosmarinate de butyle ( $R_4$ ), le rosmarinate d'octyle ( $R_8$ ) et le rosmarinate de décyle ( $R_{10}$ ) est comprise entre 40% et 45% à 25  $\mu$ M. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la lipophilisation de l'acide rosmarinique par C4, C8 et C10 n'influence pas significativement ses capacités antioxydantes intrinsèques mais modifie significativement son transport à travers la membrane. En effet, la concentration intracellulaire relative de  $R_4$ ,  $R_8$  et  $R_{10}$ , estimée par microscopie confocale, est supérieure à celle de l'acide rosmarinique, avec une acuité particulière pour  $R_8$  et  $R_{10}$ . Nous avons par la suite déterminé la localisation des différents esters grâce à une sonde spécifique des mitochondries : le mitotracker red. Nous montrons ainsi que la localisation intracellulaire de ces phénolipides était fonction de la longueur de la chaîne alkyle :  $R_4$  présente une localisation cytoplasmique diffuse alors que  $R_8$  et  $R_{10}$  sont localisés dans les mitochondries. Lorsque les cellules sont traitées par  $R_{16}$  et  $R_{18}$ , la quantité d'EROs n'est que peu affectée par la présence de l'antioxydant. Nous avons pu montrer que la faible efficacité de ces phénolipides à longues chaînes était liée à leur incapacité à traverser efficacement la membrane plasmique. En effet, la diffusion de ces deux esters est fortement limitée par leur caractère très hydrophobe. Cette propriété diminue leur solubilité, génère des agrégats à l'extérieur de la cellule et conduit à une faible diffusion des esters dans le cytoplasme.

Après 24 heures de traitement, R, R<sub>4</sub>, R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub> ont les mêmes potentiels antioxydants. Cependant, leur mécanisme d'action est différent. L'acide rosmarinique et le butyle rosmarinate agiraient d'abord comme des antioxydants, puis leurs formes quinones engendreraient un effet pro-oxydant susceptible d'augmenter la quantité d'EROs. Néanmoins, aucun effet toxique n'a été observé. Quant à R<sub>16</sub> et R<sub>18</sub>, leur concentration intracellulaire relative s'avère à la limite de la détection comparée à R et R<sub>4</sub>. Ainsi, une diffusion lente leur permettrait de réduire la quantité d'EROs d'environ 46% à 25 µM. Leur comportement cytoplasmique est identique à celui de l'acide rosmarinique. L'hypothèse d'une activité antioxydante intrinsèque particulièrement élevée reste à vérifier, compte-tenu de la faible concentration de ces phénolipides observée dans la cellule à 24 heures.

Pour ces temps de traitement plus longs (24 h), là encore les meilleures capacités antioxydantes sont obtenues pour R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub>. Leur localisation mitochondriale est donc un avantage par rapport à celle des autres esters et à celle de l'acide rosmarinique qui sont cytoplasmiques. Néanmoins, ces esters s'organisent également sous forme de micelles dans le cytoplasme. Ainsi, le fait de piéger les EROs sur leur lieu majeur de production, les mitochondries, protège ces organites contre les altérations induites par le stress oxydant, mais limite également leur transfert dans le cytosol. Par ailleurs l'accumulation de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> dans ce dernier compartiment permet aussi de piéger les EROs cytoplasmiques. Nous pouvons donc supposer qu'une action à la fois cytoplasmique et mitochondriale est en partie à l'origine de l'efficacité particulière de ces esters. La compréhension de l'adressage spécifique de R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> dans les mitochondries, est un élément important qui pourrait être abordé par l'utilisation de mitochondries isolées. Cette approche permettrait notamment d'identifier la localisation dans l'organite de ces phénolipides (matrice, membrane interne ou externe, espace intracellulaire). De même, en culture cellulaire, l'utilisation de la sonde mitosox sensible aux EROs, localisée dans l'organite, pourrait permettre de mettre en évidence l'activité antioxydante de ces phénolipides directement dans la mitochondrie.

Cependant, si nos résultats ont clairement montré que le rosmarinate de décyle était un antioxydant très prometteur en raison non seulement de sa forte activité liée notamment à sa capacité à franchir la membrane cellulaire mais aussi et surtout du fait de sa localisation mitochondriale, nous avons également mis en évidence que

cette molécule est cytotoxique à des concentrations élevées. En effet, la présence de vacuoles cytoplasmiques qui pourrait refléter l'induction de processus autophagiques, ou d'agrégats intracellulaires nous a conduits à tester l'influence de R<sub>10</sub> sur la viabilité cellulaire. A 50 µM, plus de 80% des cellules traitées par ce phénolipide avaient engagé un processus de nécrose ou d'apoptose. Ce phénomène pourrait être mieux défini à l'avenir en utilisant des marqueurs de l'apoptose tels que l'annexine 5, l'activité de la caspase 3, ou l'équilibre entre l'expression de Bcl2 et Bax. La présence d'un processus autophagique pourrait être vérifiée en observant la dimérisation de la protéine LC3. Par contre, de manière intéressante, nous n'avons détecté aucune mortalité cellulaire significative après traitement par R<sub>10</sub> à la concentration de 10 µM, qui réduit de manière importante la quantité d'EROs intracellulaires (65%). Cette dernière observation s'avère très prometteuse dans la mesure où elle ouvre des perspectives particulièrement intéressantes en ce qui concerne l'utilisation de R<sub>10</sub> dans la prévention du stress oxydant. Cependant, la biodisponibilité réelle de cette molécule *in vivo* reste à apprécier en étudiant sa sensibilité à l'activité de la flore intestinale, sa capacité à franchir la paroi intestinale, et sa stabilité dans la circulation. Néanmoins, notre travail permet d'ouvrir la voie à des études *in vivo* chez le rat ou la souris, afin de tester l'efficacité préventive réelle de ce phénolipide sur l'apparition de maladies métaboliques chez des animaux soumis à un régime diabétogène, générateur de stress oxydant.

## Références bibliographiques

- Adachi, S. and T. Kobayashi (2005). "Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent." Journal of Bioscience and Bioengineering **99**(2): 87-94.
- Aggarwal, B. B. and K. B. Harikumar (2009). "Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases." The International Journal of Biochemistry and Cell Biology **41**(1): 40-59.
- Aissa, I., R. M. Sghair, M. Bouaziz, D. Laouini, S. Sayadi and Y. Gargouri (2012). "Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities." Lipids in Health and Disease **11**: 13.
- Allen, T. M. and P. R. Cullis (2004). "Drug delivery systems: Entering the mainstream." Science **303**(5665): 1818-1822.
- An, C. B., D. Li, R. Lang, Y. Z. Bu, S. Wang, E. H. Zhang, P. Wang, X. C. Ai, J. P. Zhang and L. H. Skibsted (2011). "Chain Length Effects in Isoflavonoid Daidzein Alkoxy Derivatives as Antioxidants: A Quantum Mechanical Approach." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(23): 12652-12657.
- Anderson, E. M., K. M. Larsson and O. Kirk (1998). "One Biocatalyst–Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis." Biocatalysis and Biotransformation **16**(3): 181-204.
- Anderson, M. T., F. J. T. Staal, C. Gitler and L. A. Herzenberg (1994). "Separation of oxidant-initiated and redox regulated steps in the NF-Kappa-B signal transduction pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(24): 11527-11531.
- Ansel, H. C., W. P. Norred and I. L. Roth (1969). "Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Bacillus megaterium." Journal of Pharmaceutical Sciences **58**(7): 836-839.
- Arner, E. S. J. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." European Journal of Biochemistry **267**(20): 6102-6109.
- Arora, A., T. M. Byrem, M. G. Nair and G. M. Strasburg (2000). "Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids." Archives of Biochemistry and Biophysics **373**(1): 102-109.
- Aruoma, O. (1998). "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease." Journal of the American Oil Chemists' Society **75**(2): 199-212.
- Atkinson, J., T. Harroun, S. R. Wassall, W. Stillwell and J. Katsaras (2010). "The location and behavior of alpha-tocopherol in membranes." Molecular Nutrition & Food Research **54**(5): 641-651.

- Azuma, K., K. Ippoushi, M. Nakayama, H. Ito, H. Higashio and J. Terao (2000). "Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(11): 5496-5500.
- Baba, S., N. Osakabe, M. Natsume and J. Terao (2004). "Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid." Life Sciences **75**(2): 165-178.
- Babior, B. M. (2000). "The NADPH oxidase of endothelial cells." IUBMB Life **50**(4-5): 267-269.
- Babior, B. M. (2000). "Phagocytes and oxidative stress." American Journal of Medicine **109**(1): 33-44.
- Baraibar, M. A. and B. Friguet (2012). Chapter 7 - Changes of the Proteasomal System During the Aging Process. Progress in Molecular Biology and Translational Science. G. Tilman, Academic Press. **109**: 249-275.
- Barja, G. (1999). "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in state 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **31**(4): 347-366.
- Bartsch, H. and J. Nair (2006). "Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair." Langenbeck's Archives of Surgery **391**(5): 499-510.
- Bartzokis, G., D. Sultzer, J. Cummings, L. E. Holt, D. B. Hance, V. W. Henderson and J. Mintz (2000). "In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging." Archives of General Psychiatry **57**(1): 47-53.
- Battin, E. E., N. R. Perron and J. L. Brumaghim (2006). "The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity." Inorganic Chemistry **45**(2): 499-501.
- Berghe, W. V. (2012). "Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes." Pharmacological Research **65**(6): 565-576.
- Bernini, R., F. Crisante, M. Barontini, D. Tofani, V. Balducci and A. Gambacorta (2012). "Synthesis and Structure/Antioxidant Activity Relationship of Novel Catecholic Antioxidant Structural Analogues to Hydroxytyrosol and Its Lipophilic Esters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(30): 7408-7416.
- Beyer, R. E. (1994). "The relative essentiality of the antioxidative function of coenzyme-Q - the interactive role of DT-diaphorase." Molecular Aspects of Medicine **15**: 117-129.
- Beyer, R. E. (1994). "The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes - interaction with vitamin E and coenzyme Q." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **26**(4): 349-358.

- Bielski, B. H. J., D. E. Cabelli, R. L. Arudi and A. B. Ross (1985). "Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> radicals in aqueous solution " Journal of Physical and Chemical Reference Data **14**(4): 1041-1100.
- Blanco, E., A. Hsiao, A. P. Mann, M. G. Landry, F. Meric-Bernstam and M. Ferrari (2011). "Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects." Cancer Science **102**(7): 1247-1252.
- Bonechi, C., S. Martini, A. Magnani and C. Rossi (2008). "Stacking interaction study of trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) in solution by nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopy." Magnetic Resonance in Chemistry **46**(7): 625-629.
- Buisman, G. J. H., C. T. W. van Helteren, G. F. H. Kramer, J. W. Veldsink, J. T. P. Derksen and F. P. Cuperus (1998). "Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants." Biotechnology Letters **20**(2): 131-136.
- Buxton, G. V., C. L. Greenstock, W. P. Helman and A. B. Ross (1988). "Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solution." Journal of Physical and Chemical Reference Data **17**(2): 513-886.
- Cadenas, E. and K. J. A. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radical Biology and Medicine **29**(3-4): 222-230.
- Cadet, J., S. Bellon, M. Berger, A. G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo (2002). "Recent aspects of oxidative DNA damage: Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases." Biological Chemistry **383**(6): 933-943.
- Chang, W. S., Y. J. Lee, F. J. Lu and H. C. Chiang (1993). "Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase." Anticancer Research **13**(6A): 2165-2170.
- Chen, J. J. and B. P. Yu (1994). " Alterations in mitochondrial-membrane fluidity by lipid peroxidation products." Free Radical Biology and Medicine **17**(5): 411-418.
- Chigorimbo-Murefu, N. T. L., S. Riva and S. G. Burton (2009). "Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties." Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **56**(4): 277-282.
- Claiborne, A., H. Miller, D. Parsonage and R. P. Ross (1993). "Protein sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation " Faseb Journal **7**(15): 1483-1490.
- Clayton, D. A. (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA." Annual Review of Cell Biology **7**: 453-478.
- Clifford, M. N. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**(3): 362-372.

- Cohen, R. (2000). Role of Nitric Oxide in Vasomotor Regulation. Nitric Oxide and the Cardiovascular System. J. Loscalzo and J. Vita, Humana Press: 105-122.
- Conconi, M. and B. Friguet (1997). "Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90." Molecular Biology Reports **24**(1-2): 45-50.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." The FASEB Journal **17**(10): 1195-1214.
- Cordova, C. A. S. d., C. Locatelli, L. S. Assunção, B. Mattei, A. Mascarello, E. Winter, R. J. Nunes, R. A. Yunes and T. B. Creczynski-Pasa (2011). "Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line." Toxicology in Vitro **25**(8): 2025-2034.
- D'Souza, G. G. M., M. A. Wagle, V. Saxena and A. Shah (2011). "Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1807**(6): 689-696.
- Dalle-Donne, I., G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi and A. Milzani (2006). "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression." Journal of Cellular and Molecular Medicine **10**(2): 389-406.
- Day, A. J., J. M. Gee, M. S. DuPont, I. T. Johnson and G. Williamson (2003). "Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter." Biochemical Pharmacology **65**(7): 1199-1206.
- De Pinedo, A. T., P. Penalver, I. Perez-Victoria, D. Rondon and J. C. Morales (2007). "Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix." Food Chemistry **105**(2): 657-665.
- Dean, R. T., S. L. Fu, R. Stocker and M. J. Davies (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochemical Journal **324**: 1-18.
- Devínsky, F., A. Kopecka-Leitmanová, F. Sersen and P. Balgavý (1990). "Cut-off effect in antimicrobial activity and in membrane perturbation efficiency of the homologous series of N,N-dimethylalkylamine oxides." J Pharm Pharmacol **42**(11): 790-794.
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu and H. Rodriguez (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." Free Radical Biology and Medicine **32**(11): 1102-1115.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiological Reviews **82**(1): 47-95.
- Edeas, M. (2011). "Strategies to Target Mitochondria and Oxidative Stress by Antioxidants: Key Points and Perspectives." Pharmaceutical Research **28**(11): 2771-2779.



- Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes " Free Radical Biology and Medicine **11**(1): 81-128.
- Fadel, O., K. El Kirat and S. Morandat (2011). "The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1808**(12): 2973-2980.
- Fantin, V. R. and P. Leder (2006). "Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy." Oncogene **25**(34): 4787-4797.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, (269-270), 108-115.
- Figueroa-Espinoza, M. C. and P. Villeneuve (2005). "Phenolic acids enzymatic lipophilization." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(8): 2779-2787.
- Finkel, T. (2001). "Reactive Oxygen Species and Signal Transduction." IUBMB Life **52**(1): 3-6.
- Finkel, T. (2003). "Oxidant signals and oxidative stress." Current Opinion in Cell Biology **15**(2): 247-254.
- Fki, I., Z. Sahnoun and S. Sayadi (2007). "Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(3): 624-631.
- Frankel, E. N., S.-W. Huang, J. Kanner and J. B. German (1994). "Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(5): 1054-1059.
- Fulda, S., L. Galluzzi and G. Kroemer (2010). "Targeting mitochondria for cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **9**(6): 447-464.
- Galati, G., T. Chan, B. Wu and P. J. O'Brien (1999). "Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids." Chemical Research in Toxicology **12**(6): 521-525.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death and Differentiation **14**(7): 1237-1243.
- Gao, L. P., H. L. Wei, H. S. Zhao, S. Y. Xiao and R. L. Zheng (2005). "Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes." Pharmazie **60**(1): 62-65.
- Gomes, A., E. Fernandes and J. L. F. C. Lima (2005). "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **65**(2-3): 45-80.
- Grandemange, S., P. Seyer, A. Carazo, P. Becuwe, L. Pessemesse, M. Busson, C. Marsac, P. Roger, F. Casas, G. Cabello and C. Wrutniak-Cabello (2005).

- "Stimulation of mitochondrial activity by p43 overexpression induces human dermal fibroblast transformation." Cancer Research **65**(10): 4282-4291.
- Grisham, M. B., D. Jourdain and D. A. Wink (1999). "Nitric oxide - I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **276**(2): G315-G321.
- Grit, M. and D. J. A. Crommelin (1993). "Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability." Chemistry and Physics of Lipids **64**(1-3): 3-18.
- Guimaraes, S. and D. Moura (2001). "Vascular adrenoceptors: An update." Pharmacological Reviews **53**(2): 319-356.
- Gulbins, E., S. Dreschers and J. Bock (2003). "Role of mitochondria in apoptosis." Experimental Physiology **88**(1): 85-90.
- Gutteridge, J. M. C. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clinical Chemistry **41**(12B): 1819-1828.
- Guyot, B., B. Bosquette, M. Pina and J. Graille (1997). "Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium." Biotechnology Letters **19**(6): 529-532.
- Guyot, B., D. Gueule, M. Pina, J. Graille, V. Farines and M. Farines (2000). "Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeoyl quinic acid." European Journal of Lipid Science and Technology **102**(2): 93-96.
- Haber, F. and J. Weiss (1934). "The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts." Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences **147**(861): 332-351.
- Halliwell, B. (1991). "Free radicals and cardiovascular disease " Saudi Medical Journal **12**(2): 84-90.
- Halliwell, B. (2009). "The wanderings of a free radical." Free Radical Biology and Medicine **46**(5): 531-542.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease - an overview " Methods in Enzymology **186**: 1-85.
- Hamaguchi, T., K. Ono, A. Murase and M. Yamada (2009). "Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology through Different Effects on the Amyloid- $\beta$  Aggregation Pathway." The American Journal of Pathology **175**(6): 2557-2565.
- Hamilton, M. L., H. Van Remmen, J. A. Drake, H. Yang, Z. M. Guo, K. Kewitt, C. A. Walter and A. Richardson (2001). "Does oxidative damage to DNA increase with age?" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(18): 10469-10474.
- Han, X. Z., T. Shen and H. X. Lou (2007). "Dietary polyphenols and their biological significance." International Journal of Molecular Sciences **8**(9): 950-988.

- Harman (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Harrison, D., K. K. Griendling, U. Landmesser, B. Hornig and H. Drexler (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." American Journal of Cardiology **91**(3): 7A-11A.
- Horobin, R. W., S. Trapp and V. Weissig (2007). "Mitochondriotropics: A review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria." Journal of Controlled Release **121**(3): 125-136.
- Horton, K. L., K. M. Stewart, S. B. Fonseca, Q. Guo and S. O. Kelley (2008). "Mitochondria-penetrating peptides." Chemistry & Biology **15**(4): 375-382.
- Huang, J. J., T. de Paulis and J. M. May (2004). "Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells." Journal of Nutritional Biochemistry **15**(12): 722-729.
- Huang, N., C. Hauck, M.-Y. Yum, L. Rizshsky, M. P. Widrlechner, J.-A. McCoy, P. A. Murphy, P. M. Dixon, B. J. Nikolau and D. F. Birt (2009). "Rosmarinic Acid in Prunella vulgaris Ethanol Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Prostaglandin E2 and Nitric Oxide in RAW 264.7 Mouse Macrophages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(22): 10579-10589.
- Jastorff, B., R. Stormann, J. Ranke, K. Molter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka and J. Filser (2003). "How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation." Green Chemistry **5**(2): 136-142.
- Jensen, P. K. (1966). "Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation **122**(2): 157-166.
- Jones, P. and T. Vogt (2001). "Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers." Planta **213**(2): 164-174.
- Kagan, V. E., E. A. Serbinova, G. M. Koyanova, S. A. Kitanova, V. A. Tyurin, T. S. Stoytchev, P. J. Quinn and L. Packer (1990). "Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes." Free Radical Biology and Medicine **9**(2): 117-126.
- Kaldi, K. and W. Neupert (1998). "Protein translocation into mitochondria." Biofactors **8**(3-4): 221-224.
- Kanjilal, S., K. S. Shanker, K. S. Rao, K. K. Reddy, B. V. S. K. Rao, K. B. S. Kumar, M. L. Kantam and R. B. N. Prasad (2008). "Chemo-enzymatic synthesis of lipophilic ferulates and their evaluation for antioxidant and antimicrobial activities." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(12): 1175-1182.
- Karlova, T., L. Polakova, J. Smidrkal and V. Filip (2010). "Antimicrobial Effects of Fatty Acid Fructose Esters." Czech Journal of Food Sciences **28**(2): 146-149.

- Karthik, D., P. Viswanathan and C. V. Anuradha (2011). "Administration of Rosmarinic Acid Reduces Cardiopathology and Blood Pressure Through Inhibition of p22phox NADPH Oxidase in Fructose-Fed Hypertensive Rats." Journal of Cardiovascular Pharmacology **58**(5): 514-521.
- Katsoura, M. H., A. C. Polydera, L. Tsironis, A. D. Tselepis and H. Stamatis (2006). "Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency." Journal of Biotechnology **123**(4): 491-503.
- Katsoura, M. H., A. C. Polydera, L. D. Tsironis, M. P. Petraki, S. K. Rajacic, A. D. Tselepis and H. Stamatis (2009). "Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification." New Biotechnology **26**(1-2): 83-91.
- Kikuzaki, H., M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama and H. Taniguchi (2002). "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(7): 2161-2168.
- Kitsati, N., D. Fokas, M. D. Ouzouni, M. D. Mantzaris, A. Barbouti and D. Galaris (2012). "Lipophilic Caffeic Acid Derivatives Protect Cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA Damage by Chelating Intracellular Labile Iron." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(32): 7873-7879.
- Kim, D.-S., H.-R. Kim, E.-R. Woo, S.-T. Hong, H.-J. Chae and S.-W. Chae (2005). "Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase." Biochemical Pharmacology **70**(7): 1066-1078.
- Kimura, Y., H. Kanatani, M. Shima, S. Adachi and R. Matsuno (2003). "Anti-oxidant activity of acyl ascorbates in intestinal epithelial cells." Biotechnology Letters **25**(20): 1723-1727.
- Klingenberg, M., P. Riccio and H. Aquila (1978). "Isolation of ADP, ATP carriers as carboxyatractylate - protein complex from mitochondria " Biochimica Et Biophysica Acta **503**(2): 193-210.
- Ko, T. P., M. K. Safo, F. N. Musayev, M. L. Di Salvo, C. Q. Wang, S. H. Wu and D. J. Abraham (2000). "Structure of human erythrocyte catalase." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **56**: 241-245.
- Koppenol, W. H. (2001). "The Haber-Weiss cycle - 70 years later." Redox Report **6**(4): 229-234.
- Kroncke, K. D., C. V. Suschek and V. Kolb-Bachofen (2000). "Implications of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Enzyme Activity." Antioxidants & Redox Signaling **2**(3): 585-605.
- Laguerre, M (2009). Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques: étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire. Thèse, Biochimie, chimie des aliments. Université Montpellier II

- Laguerre, M., L. J. L. Giraldo, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza, B. Barea, J. Weiss, E. A. Decker and P. Villeneuve (2009). "Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(23): 11335-11342.
- Laguerre, M., L. J. L. Giraldo, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza, B. Barea, J. Weiss, E. A. Decker and P. Villeneuve (2010). "Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(5): 2869-2876.
- Laguerre, M., J. Lecomte and P. Villeneuve (2007). "Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges." Progress in Lipid Research **46**(5): 244-282.
- Laguerre, M., L. J. Lopez-Giraldo, J. Lecomte, B. Barea, E. Cambon, P. F. Tchobo, N. Barouh and P. Villeneuve (2008). "Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe." Analytical Biochemistry **380**(2): 282-290.
- Laguerre, M., C. Wrutniak-Cabello, B. Chabi, L. J. L. Giraldo, J. Lecomte, P. Villeneuve and G. Cabello (2011). "Does hydrophobicity always enhance antioxidant drugs? A cut-off effect of the chain length of functionalized chlorogenate esters on ROS-overexpressing fibroblasts." Journal of Pharmacy and Pharmacology **63**(4): 531-540.
- Laguerre, M., C. Bayrasy, J. Lecomte, B. Chabi, E. A. Decker, C. Wrutniak-Cabello, G. Cabello and P. Villeneuve (2013) "How to boost antioxidants by lipophilization?" Biochimie **95**(1): 20-26.
- Lançon, A., D. Delma, H. Osman, J. P. Thénot and L. B. J. N (2004). "Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process." Biochemical and Biophysical Research Communications **316**(4): 1132-1137.
- Landis, G. N. and J. Tower (2005). "Superoxide dismutase evolution and life span regulation." Mechanisms of Ageing and Development **126**(3): 365-379.
- Laszlo, J. A., K. O. Evans, D. L. Compton and M. Appell (2012). "Dihydrolipoyl dioleoylglycerol antioxidant capacity in phospholipid vesicles." Chemistry and Physics of Lipids **165**(2): 160-168.
- Laszlo, J. A., K. O. Evans, K. E. Vermillion and M. Appell (2010). "Feruloyl Dioleoylglycerol Antioxidant Capacity in Phospholipid Vesicles." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(9): 5842-5850.
- Le, S. B., E. L. Holmuhamedov, V. L. Narayanan, E. A. Sausville and S. H. Kaufmann (2006). "Adaphostin and other anticancer drugs quench the fluorescence of mitochondrial potential probes." Cell Death and Differentiation **13**(1): 151-159.

- Lecomte, J., L. J. L. Giraldo, M. Laguerre, B. Barea and P. Villeneuve (2010). "Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic Acid Fatty Esters." Journal of the American Oil Chemists Society **87**(6): 615-620.
- Lee, H. J., H.-S. Cho, E. Park, S. Kim, S.-Y. Lee, C.-S. Kim, D. K. Kim, S.-J. Kim and H. S. Chun (2008). "Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis." Toxicology **250**(2-3): 109-115.
- Lemaire-Ewing, S., C. Desrumaux, D. Neel and L. Lagrost (2010). "Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is alpha-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat?" Molecular Nutrition & Food Research **54**(5): 631-640.
- Leopoldini, M., N. Russo and M. Toscano (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." Food Chemistry **125**(2): 288-306.
- Li, J., J. Wang, L. X. Zhang, S. S. Gu, F. A. Wu and Y. W. Guo (2012). "Progress of Lipase-Catalyzed Ester Synthesis in Ionic Liquid." Chinese Journal of Organic Chemistry **32**(7): 1186-1194.
- Lin, C. M., C. S. Chen, C. T. Chen, Y. C. Liang and J. K. Lin (2002). "Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase." Biochemical and Biophysical Research Communications **294**(1): 167-172.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Advanced Drug Delivery Reviews **23**(1-3): 3-25.
- Liu, X. L., B. Testa and A. Fahr (2011). "Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation." Pharmaceutical Research **28**(5): 962-977.
- Liu, Y. B., G. Fiskum and D. Schubert (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." Journal of Neurochemistry **80**(5): 780-787.
- Locatelli, C., R. Rosso, M. C. Santos-Silva, C. A. de Souza, M. A. Licínio, P. Leal, M. L. Bazzo, R. A. Yunes and T. B. Creczynski-Pasa (2008). "Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells." Bioorganic & Medicinal Chemistry **16**(7): 3791-3799.
- López Giraldo, L. J., M. Laguerre, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, N. Barouh, B. Baréa and P. Villeneuve (2007). "Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium." Enzyme and Microbial Technology **41**(6-7): 721-726.
- Lucas, R., F. Comelles, D. Alcantara, O. S. Maldonado, M. Curcuroze, J. L. Parra and J. C. Morales (2010). "Surface-Active Properties of Lipophilic Antioxidants Tyrosol and Hydroxytyrosol Fatty Acid Esters: A Potential Explanation for the

- Nonlinear Hypothesis of the Antioxidant Activity in Oil-in-Water Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(13): 8021-8026.
- Magder, S. (2006). "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" Critical Care **10**(1):208.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **424**(1-2): 83-95.
- Mateos, R., M. Trujillo, G. Pereira-Caro, A. Madrona, A. Cert and J. L. Espartero (2008). "New Lipophilic Tyrosyl Esters. Comparative Antioxidant Evaluation with Hydroxytyrosyl Esters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(22): 10960-10966.
- Matsuura, E., G. R. V. Hughes and M. A. Khamashta (2008). "Oxidation of LDL and its clinical implication." Autoimmunity Reviews **7**(7): 558-566.
- Maurer, N., D. B. Fenske and P. R. Cullis (2001). "Developments in liposomal drug delivery systems." Expert Opinion on Biological Therapy **1**(6): 923-947.
- McMillin, J. B. and W. Dowhan (2002). "Cardiolipin and apoptosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1585**(2-3): 97-107.
- Medina, I., S. Lois, D. Alcantara, R. Lucas and J. C. Morales (2009). "Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(20): 9773-9779.
- Metodiewa, D., A. K. Jaiswal, N. Cenas, E. Dickancaité and J. Segura-Aguilar (1999). "Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product." Free Radical Biology and Medicine **26**(1-2): 107-116.
- Meves, A., S. N. Stock, A. Beyerle, M. R. Pittelkow and D. Peus (2002). "Vitamin C derivative ascorbyl palmitate promotes ultraviolet-B-induced lipid peroxidation and cytotoxicity in keratinocytes." Journal of Investigative Dermatology **119**(5): 1103-1108.
- Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint and J. Remacle (1994). "Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress." Free Radical Biology and Medicine **17**(3): 235-248.
- Michiels, C. and J. Remacle (1991). "Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblasts." Toxicology **66**(2): 225-234.
- Middleton, E., C. Kandaswami and T. C. Theoharides (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacological Reviews **52**(4): 673-751.

- Molina, M. F., I. Sanchez-Reus, I. Iglesias and J. Benedi (2003). "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver." Biological & Pharmaceutical Bulletin **26**(10): 1398-1402.
- Muller, F. L., Y. H. Liu and H. Van Remmen (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." Journal of Biological Chemistry **279**(47): 49064-49073.
- Munin, A. and F. Edwards-Lévy (2011). "Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review." Pharmaceutics **3**(4): 793-829.
- Muñoz-Muñoz, J. L., F. Garcia-Molina, E. Ros, J. Tudela, F. Garcia-Canovas and J. N. Rodriguez-Lopez (2012). "Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid." Journal of Food Biochemistry.
- Muroi, H., K.-i. Nihei, K. Tsujimoto and I. Kubo (2004). "Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*." Bioorganic & Medicinal Chemistry **12**(3): 583-587.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochemical Journal **417**: 1-13.
- Murphy, M. P. and R. A. J. Smith (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Palo Alto, Annual Reviews. **47**: 629-656.
- Muruganandam, A., C. Drouillard, R. J. Thibert, R. M-C.Cheung, T. F.Draisey and B. Mutus (1992). "Glutathione metabolic enzyme activities in diabetic platelets as a function of glycemic control." Thrombosis Research **67**(4): 385-397.
- Nicholls, D. G. (2002). "Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **34**(11): 1372-1381.
- Nieminen, A. L., A. M. Byrne, B. Herman and J. J. Lemasters (1997). "Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species." American Journal of Physiology-Cell Physiology **272**(4): C1286-C1294.
- Niki, E. (2010). "Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo." Free Radical Biology and Medicine **49**(4): 503-515.
- Nordberg, J. and E. S. J. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radical Biology and Medicine **31**(11): 1287-1312.
- Oehlke, K., A. Heins, H. Stockmann and K. Schwarz (2010). "Impact of emulsifier microenvironments on acid-base equilibrium and activity of antioxidants." Food Chemistry **118**(1): 48-55.
- Okushio, K., M. Suzuki, N. Matsumoto, F. Nanjo and Y. Hara (1999). "Methylation of tea catechins by rat liver homogenates." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **63**(2): 430-432.



- Olinski, R., A. Siomek, R. Rozalski, D. Gackowski, M. Foksinski, J. Guz, T. Dziaman, A. Szpila and B. Tudek (2007). "Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases." Acta Biochimica Polonica **54**(1): 11-26.
- Osakabe, N., A. Yasuda, M. Natsume and T. Yoshikawa (2004). "Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model." Carcinogenesis **25**(4): 549-557.
- Palha, J. A. (2002). "Transthyretin as a thyroid hormone carrier: Function revisited." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **40**(12): 1292-1300.
- Pallauf, K. and G. Rimbach (2013). "Autophagy, polyphenols and healthy ageing." Ageing Research Reviews **12**(1): 237-252.
- Panya, A., M. Laguerre, C. Bayrasy, J. Lecomte, P. Villeneuve, D. J. McClements and E. A. Decker (2012). "An Investigation of the Versatile Antioxidant Mechanisms of Action of Rosmarinate Alkyl Esters in Oil-in-Water Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(10): 2692-2700.
- Park, K. D. and S. J. Cho (2010). "Synthesis and antimicrobial activities of 3-O-alkyl analogues of (+)-catechin: Improvement of stability and proposed action mechanism." European Journal of Medicinal Chemistry **45**(3): 1028-1033.
- Pearson, P., S. A. Lewis, J. Britton, I. S. Young and A. Fogarty (2006). "The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo." Biodrugs **20**(5): 271-273.
- Pena, A. A. and C. A. Miller (2006). "Solubilization rates of oils in surfactant solutions and their relationship to mass transport in emulsions." Advances in Colloid and Interface Science **123**: 241-257.
- Perron, N. R. and J. L. Brumaghim (2009). "A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding." Cell Biochemistry and Biophysics **53**(2): 75-100.
- Petersen, M. and M. S. J. Simmonds (2003). "Rosmarinic acid." Phytochemistry **62**(2): 121-125.
- Pfanner, N. and K. N. Truscott (2002). "Powering mitochondrial protein import." Nature Structural Biology **9**(4): 234-236.
- Pirker, K. F., C. W. M. Kay, K. Stolze, D. Tunega, T. G. Reichenauer and B. A. Goodman (2009). "Free radical generation in rosmarinic acid investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy." Free Radical Research **43**(1): 47-57.
- Piskula, M. K. and J. Terao (1998). "Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues." Journal of Nutrition **128**(7): 1172-1178.
- Porter, W. L. (1993). "Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems " Toxicology and Industrial Health **9**(1-2): 93-122.

- Porter, W. L., E. D. Black and A. M. Drolet (1989). "Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions - contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems " Journal of Agricultural and Food Chemistry **37**(3): 615-624.
- Pratico, D., R. K. Tangirala, D. J. Rader, J. Rokach and G. A. FitzGerald (1998). "Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Nature Medicine **4**(10): 1189-1192.
- Pryor, W. A. (2000). "Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials." Free Radical Biology and Medicine **28**(1): 141-164.
- Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus and L. Pouységu (2011). "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis." Angewandte Chemie International Edition **50**(3): 586-621.
- Reddy, K. K., K. S. Shenker, T. Ravinder, R. B. N. Prasad and S. Kanjilal (2010). "Chemo-enzymatic synthesis and evaluation of novel structured phenolic lipids as potential lipophilic antioxidants." European Journal of Lipid Science and Technology **112**(5): 600-608.
- Renaud, S. and M. Delorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart - disease " Lancet **339**(8808): 1523-1526.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radical Biology and Medicine **20**(7): 933-956.
- Richter, C., J. W. Park and B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(17): 6465-6467.
- Rietjens, I. M. C. M., M. G. Boersma, L. d. Haan, B. Spenkelink, H. M. Awad, N. H. P. Cnubben, J. J. van Zanden, H. v. d. Woude, G. M. Alink and J. H. Koeman (2002). "The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids." Environmental Toxicology and Pharmacology **11**(3-4): 321-333.
- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sciences **84**(21-22): 705-712.
- Rocha, S., R. Generalov, M. d. C. Pereira, I. Peres, P. Juzenas and M. A. N. Coelho (2010). "Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention." Nanomedicine **6**(1): 79-87.
- Rolfe, D. F. S. and G. C. Brown (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals." Physiological Reviews **77**(3): 731-758.
- Ross, J. A. and C. M. Kasum (2002). "Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety." Annual Review of Nutrition **22**: 19-34.

- Royall, J. A. and H. Ischiropoulos (1993). "Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent- probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells." Archives of Biochemistry and Biophysics **302**(2): 348-355.
- Sabally, K., S. Karboune, R. St-Louis and S. Kermasha (2006). "Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids." Journal of the American Oil Chemists Society **83**(2): 101-107.
- Salem, J. H., C. Humeau, I. Chevalot, C. Harscoat-Schiavo, R. Vanderesse, F. Blanchard and M. Fick (2010). "Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters." Process Biochemistry **45**(3): 382-389.
- Sasaki, K., J. Alamed, J. Weiss, P. Villeneuve, L. J. L. Giraldo, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza and E. A. Decker (2010). "Relationship between the physical properties of chlorogenic acid esters and their ability to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions." Food Chemistry **118**(3): 830-835.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." Journal of Nutrition **130**(8): 2073S-2085S.
- Schwartz, M. P. and A. Matouschek (1999). "The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(23): 13086-13090.
- Seyer, P., S. Grandemange, L. Pessemesse, F. Casas, G. Cabello and C. Wrutniak-Cabello (2006). "Mitochondrial activity is a major regulator of myoblast differentiation and of the expression of myosin isoforms." Productions Animales **19**(4): 279-286.
- Seyer, P., S. Grandemange, P. Rochard, M. Busson, L. Pessemesse, F. Casas, G. Cabello and C. Wrutniak-Cabello (2011). "P43-dependent mitochondrial activity regulates myoblast differentiation and slow myosin isoform expression by control of Calcineurin expression." Experimental Cell Research **317**(14): 2059-2071.
- Shahidi, F. and Y. Zhong (2007). Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. Antioxidant Measurement and Applications. F. Shahidi and C. T. Ho. Washington, Amer Chemical Soc. **956**: 36-66.
- Shahidi, F. and Y. Zhong (2011). "Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(8): 3499-3504.
- Shen, S. Q., Y. Zhang, J. J. Xiang and C. L. Xiong (2007). "Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes." World Journal of Gastroenterology **13**(13): 1953-1961.
- Sherer, T. B., R. Betarbet, J. H. Kim and J. T. Greenamyre (2003). "Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease." Neuroscience Letters **341**(2): 87-90.

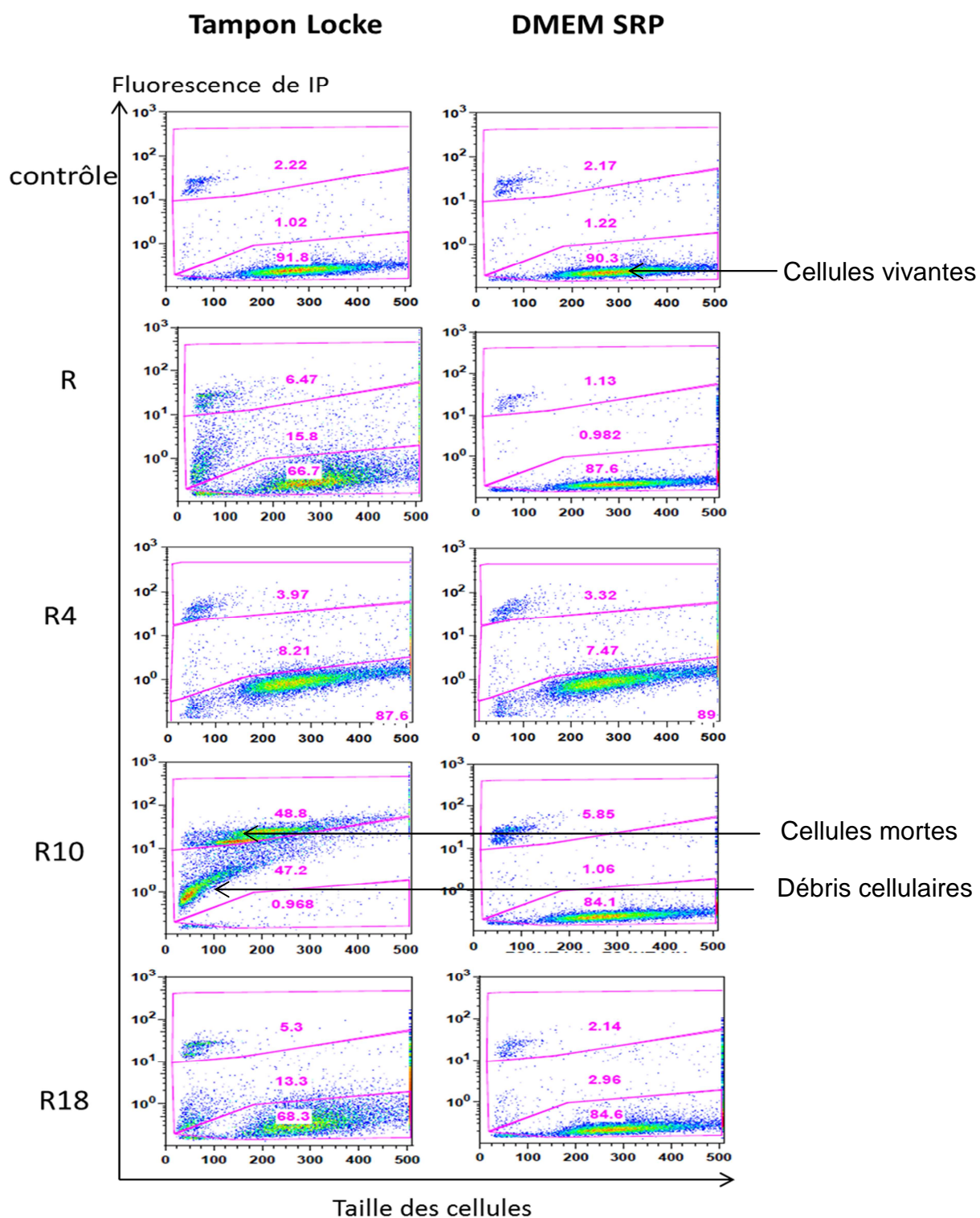
- Sheu, S. S., D. Nauduri and M. W. Anders (2006). "Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1762**(2): 256-265.
- Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara and Y. Tominaga (2002). "Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing." Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **17**(3-5): 133-142.
- Shults, C. W., M. F. Beal, D. Song and D. Fontaine (2004). "Pilot trial of high dosages of coenzyme Q(10) in patients with Parkinson's disease." Experimental Neurology **188**(2): 491-494.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of Oxidative Stress." Angewandte Chemie International Edition in English **25**(12): 1058-1071.
- Sies, H. (1991). "Oxidative stress- from basic research to clinical - application " American Journal of Medicine **91**: S31-S38.
- Smith, R. A. J., C. M. Porteous, A. M. Gane and M. P. Murphy (2003). "Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(9): 5407-5412.
- Sohal, R. S., R. J. Mockett and W. C. Orr (2002). "Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis." Free Radical Biology and Medicine **33**(5): 575-586.
- Soobrattee, M. A., V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma and T. Bahorun (2005). "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **579**(1-2): 200-213.
- Sorensen, A. D. M., N. S. Nielsen, Z. Y. Yang, X. B. Xu and C. Jacobsen (2012). "Lipophilization of dihydrocaffeic acid affects its antioxidative properties in fish-oil-enriched emulsions." European Journal of Lipid Science and Technology **114**(2): 134-145.
- Souza, H. P., F. R. M. Laurindo, R. C. Ziegelstein, C. O. Berlowitz and J. L. Zweier (2001). "Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **280**(2): H658-H667.
- Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging " Science **257**(5074): 1220-1224.
- Stone, J. R. and S. P. Yang (2006). "Hydrogen peroxide: A signaling messenger." Antioxidants & Redox Signaling **8**(3-4): 243-270.
- Storz, P. (2005). "Reactive oxygen species in tumor progression." Frontiers in Bioscience **10**: 1881-1896.
- Sun, S., G. Yang, Y. Bi and F. Xiao (2009). "Chemoenzymatic synthesis of feruloylated monoacyl- and diacyl-glycerols in ionic liquids." Biotechnology Letters **31**(12): 1885-1889.

- Suntres, Z. and A. Omri (2006). The Role of Liposomal Antioxidants in Oxidative Stress. Nanocarrier Technologies. M. R. Mozafari, Springer Netherlands: 191-205.
- Swain, S. D., T. T. Rohn and M. T. Quinn (2002). "Neutrophil priming in host defense: Role of oxidants as priming agents." Antioxidants & Redox Signaling **4**(1): 69-83.
- Szeto, H. H. (2006). "Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents." Aaps Journal **8**(3): E521-E531.
- Takahashi, M., E. Komuro, E. Niki and K. Tanaka (1992). "Action of fatty acid esters of L-ascorbic acid as antioxidants in phosphatidylcholine liposomal membranes." Bulletin of the Chemical Society of Japan **65**(3): 679-684.
- Takayama, K., H. Hirose, G. Tanaka, S. Pujals, S. Katayama, I. Nakase and S. Futaki (2012). "Effect of the Attachment of a Penetration Accelerating Sequence and the Influence of Hydrophobicity on Octaarginine-Mediated Intracellular Delivery." Molecular Pharmaceutics **9**(5): 1222-1230.
- Tavafi, M., H. Ahmadvand, A. Khalatbari and A. Tamjidipoor (2011). "Rosmarinic Acid Ameliorates Diabetic Nephropathy in Uninephrectomized Diabetic Rats." Iranian Journal of Basic Medical Sciences **14**(3): 275-283.
- Tofani, D., V. Balducci, T. Gasperi, S. Incerpi and A. Gambacorta (2010). "Fatty Acid Hydroxytyrosyl Esters: Structure/Antioxidant Activity Relationship by ABTS and in Cell-Culture DCF Assays." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(9): 5292-5299.
- Torchilin, V. P. (2006). Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. Annual Review of Biomedical Engineering. Palo Alto, Annual Reviews. **8**: 343-375.
- Toussaint, O. and J. Remacle (1994). "Review of the theories of cellular aging - from hayflicks concept to the concept of critical threshold of error accumulation an updated review " Pathologie Biologie **42**(4): 313-321.
- Trodler, P. and J. Pleiss (2008). "Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents." Bmc Structural Biology **8**:9.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." Journal of Physiology-London **552**(2): 335-344.
- Turrens, J. F. and A. Boveris (1980). "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart - mitochondria." Biochemical Journal **191**(2): 421-427.
- Turrens, J. F., B. A. Freeman, J. G. Levitt and J. D. Crapo (1982). "The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles." Archives of Biochemistry and Biophysics **217**(2): 401-410.
- Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Progress in Lipid Research **42**(4): 318-343.

- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chemico-Biological Interactions **160**(1): 1-40.
- Vericel, E., C. Januel, M. Carreras, P. Moulin and M. Lagarde (2004). "Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status." Diabetes **53**(4): 1046-1051.
- Villeneuve, P. (2007). "Lipases in lipophilization reactions." Biotechnology Advances **25**(6): 515-536.
- Visioli, F., C. A. De La Lastra, C. Andres-Lacueva, M. Aviram, C. Calhau, A. Cassano, M. D'Archivio, A. Faria, G. Fave, V. Fogliano, R. Llorach, P. Vitaglione, M. Zoratti and M. Edeas (2011). "Polyphenols and Human Health: A Prospectus." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **51**(6): 524-546.
- Viskupicova, J., M. Danihelova, M. Ondrejovic, T. Liptaj and E. Sturdik (2010). "Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods." Food Chemistry **123**(1) 45-50 **123**(1): 45-50.
- Walters, W. P. (2012). "Going further than Lipinski's rule in drug design." Expert Opinion on Drug Discovery **7**(2): 99-107.
- Wisman, K. N., A. A. Perkins, M. D. Jeffers and A. E. Hagerman (2008). "Accurate assessment of the bioactivities of redox-active polyphenolics in cell culture." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(17): 7831-7837.
- Yamauchi, T., K. Ohki, H. Maruyama and Y. Nozawa (1981). "Thermal adaptation of tetrahymena membranes with special reference to mitochondria- role of cardiolipin in fluidity of mitochondrial membranes " Biochimica Et Biophysica Acta **649**(2): 385-392.
- Yamazaki, S., N. Ozawa, A. Hiratsuka and T. Watabe (1999). "Increases in cholesterol 7-hydroperoxides in lipids of human skin by sunlight exposure." Free Radical Biology and Medicine **26**(9-10): 1126-1133.
- Zhao, K. S., G. M. Zhao, D. L. Wu, Y. Soong, A. V. Birk, P. W. Schiller and H. H. Szeto (2004). "Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury." Journal of Biological Chemistry **279**(33): 34682-34690.

# Annexes

## Annexe 1 : Cytotoxicité des rosmarinates d'alkyle



Cytotoxicité de l'acide rosmarinique et de ses esters à 25 µM dans le tampon Locke et dans le DMEM SRP après deux heures de traitement.

La viabilité cellulaire est estimée par le pourcentage de fluorescence de l'iodure de propidium (IP) en fonction de la taille des cellules (nm). Trois populations sont déterminées à partir des cellules non traitées (contrôle) : 1) Les cellules vivantes avec une taille comprise entre 200 et 300 nm, et un taux de fluorescence de l'IP très faible, 2) Les cellules mortes avec une taille comprise entre 100 et 200 nm, et un taux de fluorescence maximal, 3) Les débris cellulaires sont de tailles inférieures à 100 nm avec un taux de fluorescence bas.



## **Influence de la lipophilisation de l'acide rosmarinique sur ses propriétés antioxydantes**

De nos jours, l'apport de polyphénols s'avère être bénéfique dans la lutte contre les dommages oxydatifs liés au stress oxydant. Cependant, leur biodisponibilité est limitée par leur polarité. Pour contourner ce problème, une des stratégies consiste à ajuster la lipophilie de l'antioxydant par des réactions de lipophilisation mettant en jeu un vecteur lipidique. Ainsi, des précédentes études ont montré que l'activité antioxydante était directement liée à la longueur de la chaîne alkyle greffée et ont également révélé un effet non linéaire dit effet « cut-off ».

L'objectif de notre étude a donc été de comprendre l'effet non linéaire de la lipophilisation sur l'activité antioxydante de l'acide rosmarinique. Ainsi, des rosmarinates d'alkyle et de diacylglycérol ont été synthétisés, et leurs propriétés antioxydantes évaluées sur des fibroblastes surexprimant une quantité d'EROs. L'effet « cut-off » a été à nouveau observé avec ces phénolipides. En effet, le rosmarinate de décyle et le 1-rosmarinoyl-2,3-dilauroyl glycérol sont les antioxydants les plus actifs. Cependant, la série des rosmarinates d'alkyle étant la plus efficace, l'influence du vecteur lipidique a été étudié uniquement sur cette dernière.

Il a été ainsi constaté que la lipophilisation de l'acide rosmarinique avec une chaîne alkyle de 4 à 10 atomes de carbone améliore son transport au sein de la cellule, alors que les esters à 16 et 18 atomes de carbone s'organisent sous forme d'agrégats extracellulaires limitant ainsi leur internalisation. De plus, alors qu'une partie de ces esters est localisée dans le cytoplasme, tout comme l'acide rosmarinique et le rosmarinate de butyle, le rosmarinate de décyle est en revanche situé dans la mitochondrie. Cette propriété en fait donc une molécule très prometteuse pour la conception de nouveaux antioxydants à activité mitochondriale ciblée. Néanmoins, sa cytotoxicité joue un rôle majeur dans son mécanisme d'action. A fortes concentrations, il affecte la viabilité cellulaire, tandis qu'à faibles concentrations, aucun effet cytotoxique notable n'est mis en évidence.

*Mots clés: lipophilisation, acide rosmarinique, décyl rosmarinate, cellules, activité antioxydant, effet « cut-off », ciblage mitochondrial, toxicité*

## **Influence of the lipophilization of rosmarinic acid on their antioxidant properties.**

Nowadays, polyphenols supply has proved to be beneficial against oxidative damages linked to oxidative stress. However, their bioavailability is limited by their polarity. To solve the issue, one strategy consists in adjusting the antioxidant hydrophobicity by lipophilization reactions with lipidic carriers. Indeed, previous studies showed that antioxidant activity was directly linked to the alkyl chain length grafted and also revealed a “cut-off” effect.

The objective of this study is to understand this nonlinear effect of the lipophilization of rosmarinic acid on antioxidant activity. Thus, alkyl rosmarinate and diacylglycerol rosmarinate were synthesized and their antioxidant activity was evaluated into fibroblasts cells overexpressing radical oxygen species. The “cut-off” effect was again observed with these phenolipids. In fact, decyl rosmarinate and dilauroyl rosmarinate were shown to be the best antioxidants. The lipophilization of rosmarinic acid with an alkyl chain from 4 to 10 carbon atoms improve its cell uptake whereas esters of 16 and 18 carbon atoms assemble in extracellular aggregate limiting their cell uptake. Furthermore, one part of these esters is located into cytoplasm like rosmarinic acid and butyl rosmarinate. On the contrary, the decyl rosmarinate ( $R_{10}$ ) is located into mitochondria. This property allows targeting mitochondria. Nevertheless, its cytotoxicity is involved in mechanism. At high concentration,  $R_{10}$  affects cell viability, while at low concentration, no cytotoxic effect is observed.

*Key words: lipophilization, rosmarinic acid, decyl rosmarinate, cells, antioxidant activity, “cut-off” effect, targeting mitochondria, cytotoxicity*